

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Krüppel-like Faktor 4 als Regulator der Inflammation in der
Pneumokokkenpneumonie“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Toni Herta

aus Dresden

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Monographie wurden bereits im Fachjournal *Scientific Reports* veröffentlicht:

Toni Herta, Aritra Bhattacharyya, Christian Bollendorf, Christin Kabus, Pedro García, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel and Janine Zahlten. *DNA-release by Streptococcus pneumoniae autolysin LytA induced Krueppel-like factor 4 expression in macrophages*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 5723.

Impact Factor (2018): 4,122 Punkte

Die Dissertation wurde im Rahmen eines Stipendiums der *Jürgen Manchot Stiftung* angefertigt, die sämtliche Lebenshaltungs- sowie Kongresskosten getragen hat. Die Daten der Dissertation wurden als Poster auf der Internationalen Konferenz des SFB-TR84 und der Leopoldina “Innate Immunity of the lung – improving pneumonia outcome” 2012 in Berlin sowie als Vortrag auf der Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP) 2012 in Münster und auf dem 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP) 2013 in Hannover vorgestellt. Der Vortrag in Münster wurde mit dem Vortragspreis „*Best of Herbsttagung 2012*“ ausgezeichnet.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
1.1 Abstract	6
2. Verzeichnisse	7
2.1 Abbildungsverzeichnis	7
2.2 Tabellenverzeichnis.....	9
2.3 Abkürzungsverzeichnis	10
3. Einleitung	14
3.1 Pneumonie	14
3.1.1 Pneumokokkenpneumonie	14
3.2 Pneumokokken	16
3.2.1 Virulenzfaktoren der Pneumokokken.....	17
3.3 Immunsystem	19
3.3.1 Elemente der angeborenen Immunantwort.....	20
3.3.2 Mustererkennende Rezeptoren	22
3.3.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)	23
3.3.2.2 C-Typ Lektinrezeptoren (CLRs)	25
3.3.2.3 NOD-like Rezeptoren (NLRs)	25
3.3.2.4 RIG-I-like Rezeptoren (RLRs).....	26
3.3.2.5 Zytoplasmatische DNA-Rezeptoren	26
3.3.3 Erkennung der Pneumokokken durch das angeborene Immunsystem.....	27
3.4 Krüppel-like Faktoren	27
3.4.1 Krüppel-like Faktor 4	28
3.5 Zytokine	29
3.6 Wissenschaftliche Fragestellung	31
4. Material und Methoden	32

4.1 Material	32
4.1.1 Zellkultur	32
4.1.1.1 Verwendete Primärzellen	32
4.1.1.2 Medien Zellkultur	33
4.1.1.3 Substanzen und Verbrauchsmaterialien Zellkultur	34
4.1.2 Stimulantien und Inhibitoren	34
4.1.3 Bakterienkultur	35
4.1.3.1 Pneumokokkenstämme D39, D39 Δ cps, R6x, R6x Δ ply, R6x Δ lytA	35
4.1.3.2 Medien Bakterienkultur	35
4.1.3.3 Substanzen und Verbrauchsmaterialien Bakterienkultur	36
4.1.4 Molekularbiologie	36
4.1.4.1 Puffer und Lösungen	36
4.1.4.2 Gele	38
4.1.4.3 Antikörper	39
4.1.4.4 Kits	39
4.1.4.5 Substanzen und Verbrauchsmaterialien Molekularbiologie	40
4.1.5 Geräte	41
4.2 Methoden	42
4.2.1 Zellbiologische Methoden	42
4.2.1.1 Kultur von murinen Fibroblasten	42
4.2.1.2 Isolation von murinen Knochenmarkszellen	42
4.2.1.3 Differenzierung der murinen Knochenmarkszellen in Makrophagen	43
4.2.1.4 Behandlung der Makrophagen mit Stimulatoren und Inhibitoren	43
4.2.2 Mikrobiologische Methoden	44
4.2.2.1 Kultur von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	44
4.2.2.2 Stimulation der Makrophagen mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	45
4.2.2.3 Inaktivierung von Pneumokokken	45
4.2.2.4 Inhibierung der Phagozytose und Phagozytose-Assay	45
4.2.3 Molekularbiologische Methoden	46
4.2.3.1 Präparation von DNA und DNase-Verdau	46
4.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	47
4.2.3.3 Präparation bakterieller RNA	47
4.2.3.4 Western Blot	48
4.2.3.5 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	49

4.2.3.6 Statistik.....	49
5. Ergebnisse	50
5.1 Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in Makrophagen	50
5.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> induziert dosisabhängig KLF4 in BMMs.....	50
5.1.2 Die <i>Streptococcus pneumoniae</i> -induzierte KLF4 Expression in BMMs ist nur teilweise TLR9- und MyD88-abhängig und unabhängig von den Src-Kinasen	51
5.1.3 Die Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken ist teilweise abhängig von TRIF, aber unabhängig von NOD2, TLR2, SIGN-R1, Ply und den Inflammasomen	53
5.1.4 Bekapselte Pneumokokken induzieren KLF4 in BMMs schwächer, die KLF4-Induktion ist jedoch Phagozytose-unabhängig.....	56
5.1.5 Für die Induktion von KLF4 müssen Pneumokokken direkten Kontakt mit den BMMs haben, lebendig sein und replizieren.....	57
5.1.6 Um KLF4 in BMMs zu induzieren, müssen Pneumokokken autolysieren.....	59
5.1.7 Für die Induktion von KLF4 in BMMs ist direkter Kontakt mit den Pneumokokken sowie freie DNA notwendig.....	60
5.1.8 Die Induktion von KLF4 in BMMs durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> ist unabhängig von RAGE und STING.....	62
5.1.9 Die Induktion von KLF4 in BMMs durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> ist unabhängig von Typ 1 Interferonen	63
5.2 Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	64
5.2.1 KLF4 KD BMMs imponieren nach Stimulation mit Pneumokokken stärker morphologisch verändert als KLF4 WT BMMs	65
5.2.2 KLF4 steigert die Bildung von KC und reduziert die Ausschüttung von IL-10 durch BMMs bei Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
6. Diskussion	67
6.1 Induktion von KLF4 in Makrophagen durch <i>Streptococcus pneumoniae</i>	67
6.1.1 Zuordnung der Ergebnisse zur Komponente ‚Kontakt‘ bzw. ‚freie DNA‘	68
6.1.1.1 Autolyse	68

6.1.1.2 Lebendigkeit.....	68
6.1.1.3 Replikation	68
6.1.1.4 Kontakt	69
6.1.1.5 Kapsel.....	69
6.1.1.6 Phagozytose.....	70
6.1.2 Die Komponente ‚Kontakt‘ des Induktionsmechanismus.....	70
6.1.3 Die Komponente ‚freie DNA‘ des Induktionsmechanismus.....	73
6.1.4 Die mögliche Bedeutung der Zweiteiligkeit des Induktionsmechanismus	77
6.2 Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	80
6.2.1 Regulation der Zytokinbildung in BMMs bei Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	80
6.2.2 Beeinflussung der Zerstörung der BMMs durch <i>Streptococcus pneumoniae</i>	84
6.2.3 Induktion von KLF4 als Vorteil für <i>Streptococcus pneumoniae</i>	85
6.3 Schlussfolgerung	86
6.4 Ausblick	87
7. Literaturverzeichnis.....	92
8. Anhang	109
8.1 Eidesstattliche Versicherung	109
8.2 Anteilserklärung an erfolgter Publikation	109
8.3 Lebenslauf	111
8.4 Publikationsliste	113
8.5 Danksagung	114

1. Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae ist der Haupterreger der ambulant erworbenen Pneumonie, welche jährlich weltweit geschätzte 1,2 Millionen Todesopfer fordert und ein erhebliches medizinisches und sozioökonomisches Problem darstellt. Steigende Resistenzraten der Pneumokokken gegen wirksame Antibiotika und ein bislang unzureichender Impfschutz machen die Entschlüsselung der Interaktionsmechanismen zwischen Pneumokokken und Zellen des angeborenen Immunsystems zur Erschließung neuer Therapiemöglichkeiten unabdingbar. Die Aktivierung myeloider Zellen im alveolären Kompartiment ist von entscheidender Wichtigkeit für die Eliminierung eindringender Pathogene in die Lunge. Die Ausgangshypothese der vorliegenden Dissertation lautet, dass der Stammzellfaktor Krüppel-like Faktor 4 (KLF4) für die Aktivierung von Makrophagen durch *Streptococcus pneumoniae* eine wichtige Rolle spielt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken dosisabhängig KLF4 in murinen, aus Knochenmarkszellen differenzierten Makrophagen (BMMs) induzieren. Diese Induktion erfolgt nur durch lebende Pneumokokken, die direkten Kontakt mit den BMMs haben und Autolysin LytA-abhängig DNA freisetzen. LytA-defiziente Pneumokokken können KLF4 in BMMs nicht induzieren. Werden den LytA-defizienten Pneumokokken freie prokaryotische oder fremde (humane) bzw. eigene (murine) eukaryotische DNA-Moleküle zugesetzt, wird die KLF4 Induktion wiederhergestellt. Experimente mit TLR9, MyD88 und TRIF *knockout* BMMs zeigten, dass TLR9, MyD88 und TRIF teilweise an dieser Induktion beteiligt sind. Zur Untersuchung der Funktion von KLF4 wurden BMMs aus *in vivo* mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelten ERT-Cre^{+/-}/KLF4^{loxP/loxP} (KLF4 *knockdown*) Mäusen eingesetzt. Mit Pneumokokken stimulierte KLF4 *knockdown* BMMs bildeten weniger Keratinozyten Chemokin (engl. „*keratinocyte chemoattractant*“, KC) und mehr Interleukin (IL) 10 als die entsprechenden Wildtypen. Zusammenfassend konnte im Rahmen der Dissertation gezeigt werden, dass Pneumokokken KLF4 in BMMs über TLR9, MyD88, TRIF sowie einen bisher unbekanntem DNA-Rezeptor induzieren, was zur Ausbildung eines proinflammatorischen Makrophagenphänotyps führt.

1.1 Abstract

Streptococcus pneumoniae, or pneumococcus, is the agent most prone to cause community-acquired pneumonia (CAP), resulting in 1.2 million deaths every year worldwide and therefore representing a major medical and socio-economical challenge. The increasing resistance of the pneumococci against effective antibiotics and the insufficient protection provided by vaccination underline the necessity to comprehend the interaction between the pneumococci and the innate immune cells in order to develop new therapeutic strategies. The activation of myeloid cells in the alveolar compartment is of utmost importance for eliminating invading pathogens in the lungs. The hypothesis of this thesis is that the transcription factor Krueppel-like factor 4 (KLF4) plays an essential role in the activation of macrophages by pneumococci. The results of the current analysis have shown that the pneumococci induce a dose-dependent KLF4 expression in murine bone marrow-derived macrophages (BMMs). However, only viable pneumococci, which have direct contact to the host cells and release autolysin LytA-dependent DNA, induce KLF4. Mutants lacking autolysin LytA were not able to induce KLF4. Yet, the exogenous supplementation of prokaryotic and foreign (human) or own (mouse) eukaryotic DNA restored pneumococci-related induction of KLF4 by these mutant bacteria. Experiments using TLR9, MyD88 and TRIF *knockout* BMMs revealed that TLR9, MyD88 and TRIF were partly involved in the induction of KLF4. In order to investigate the function of KLF4, BMMs of *in vivo* with 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) induced ERT-Cre^{+/-}/KLF4^{loxP/loxP} (KLF4 *knockdown*) mice were used. The loss of KLF4 expression reduced the pneumococci-dependent release of keratinocyte chemoattractant (KC) and enhanced the secretion of interleukin (IL) 10. To conclude, pneumococci-related KLF4 induction in BMMs is partly mediated via TLR9, MyD88, TRIF and a hitherto unknown host cell DNA sensor leading to a proinflammatory macrophage phenotype.

2. Verzeichnisse

2.1 Abbildungsverzeichnis

Abb 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
Abb 2: Schematische Übersicht über die Makrophagensubpopulationen.....	21
Abb 3: <i>Streptococcus pneumoniae</i> induziert KLF4 in WT BMMs	51
Abb 4: Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in BMMs ist teilweise abhängig von TLR9 und MyD88	52
Abb 5: Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in BMMs ist unabhängig von den Src-Kinasen	53
Abb 6: Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in BMMs ist teilweise abhängig von TRIF aber unabhängig von NOD2	54
Abb 7: Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in BMMs ist unabhängig von TLR2, SIGN-R1 und Pneumolysin	55
Abb 8: Inflammasome sind nicht an der Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in BMMs beteiligt.....	56
Abb 9: Bekapselte Pneumokokken induzieren KLF4 in WT BMMs schwächer, die KLF4-Induktion ist jedoch Phagozytose-unabhängig.....	57
Abb 10: Für die Induktion von KLF4 müssen die Pneumokokken direkten Kontakt mit den BMMs haben	58

Abb 11: Für die Induktion von KLF4 in BMMs müssen die Pneumokokken lebendig sein und replizieren.....	59
Abb 12: Direkter Kontakt zwischen Pneumokokken und BMMs sowie ein bei der bakteriellen Autolyse freigesetzter Faktor sind für die Induktion von KLF4 in BMMs notwendig	60
Abb 13: Für die Induktion von KLF4 in BMMs ist direkter Kontakt mit den Pneumokokken sowie freie bakterielle DNA notwendig.....	61
Abb 14: LytA-defiziente Pneumokokken induzieren auch in Kombination mit freier pro- oder eukaryotischer DNA aus anderen Organismen KLF4 in BMMs, nicht jedoch mit freier RNA	62
Abb 15: Die Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs ist unabhängig von RAGE und STING	63
Abb 16: Die Induktion von KLF4 durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> in BMMs ist unabhängig von IFNAR und IFN β	64
Abb 17: Nachweis des KLF4 <i>knockdown</i> im Western Blot.....	65
Abb 18: KLF4 KD BMMs erscheinen nach Stimulation mit Pneumokokken stärker morphologisch verändert.....	65
Abb 19: KLF4 steigert die Bildung von KC und reduziert die Bildung von IL-10 durch BMMs bei Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
Abb 20: Übersicht über die am Induktionsmechanismus von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs beteiligten Rezeptoren und Signalwege.....	79
Abb 21: Übersicht über die nicht an der Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs beteiligten Rezeptoren und Signalwege	80

2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über TLRs, Korezeptoren und Liganden	23
Tabelle 2: Medien Zellkultur.....	33
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien Zellkultur	34
Tabelle 4: Stimulantien und Inhibitoren.....	34
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Pneumokokkenstämme	35
Tabelle 6: Medien Bakterienkultur.....	35
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien Bakterienkultur	36
Tabelle 8: Puffer und Lösungen für ELISA	36
Tabelle 9: Puffer und Lösungen für Western Blot	37
Tabelle 10: Puffer für Gelelektrophorese	38
Tabelle 11: Gele für Western Blot	38
Tabelle 12: Western Blot-Antikörper (AK)	39
Tabelle 13: Kits	39
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien Molekularbiologie.....	40
Tabelle 15: Geräte	41

2.3 Abkürzungsverzeichnis

Das Abkürzungsverzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (wie usw., u.a., etc.) oder SI- (Système International d'unités) Einheiten.

A. bidest	Doppelt destilliertes Wasser
Abb	Abbildung
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
Arg-1	Arginase 1
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzelllinie
BMC	<i>bone marrow-derived cell</i>
BMM	<i>bone marrow-derived macrophage</i>
CAP	<i>community-acquired pneumonia</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CbpA	<i>choline-binding protein A</i>
CbpD	<i>choline-binding protein D</i>
CbpE	<i>choline-binding protein E</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
ChoP	Phosphorylcholin
ClpP	<i>caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit</i>
CLR	C-Typ Lektinrezeptor
c-Myc	Homolog des aviären viralen Myelocytomatose-Onkogens
Cnlp	<i>cathelicidin gene</i>
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotide
CRAMP	<i>cathelicidin-related antimicrobial peptide</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
Cys ² /His ²	Cystein ² /Histidin ² -Zinkfingerproteine
Cyto D	Cytochalasin D

DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DDX41	<i>DEAD box polypeptide 41</i>
DHX9	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>
DHX36	<i>DEAH box protein 36</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZF	<i>epithelial zinc finger</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GC	Guanin-Cytosin
GKLF	<i>gut enriched krüppel like factor</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
HAP	<i>hospital-acquired pneumonia</i>
HMGB1	<i>high-mobility-group-protein B1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsf1	<i>heat shock transcription factor 1</i>
IF116	<i>gamma-interferon-inducible protein 116</i>
IFNAR	Interferon- α/β Rezeptor
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
I κ B ζ	<i>inhibitor of nuclear factor-κB ζ</i>
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>interferon stimulated gene</i>
KC	<i>keratinocyte chemoattractant</i>

KD	<i>knockdown</i>
KLF	<i>krueppel-like factor</i>
KO	<i>knockout</i>
LL37	antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Cathelicidine
LPS	Lipopolysaccharid
Lrrfip1	<i>leucine-rich repeat (in flightless I) interacting protein-1</i>
LytA	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase
LytB	Endo- β -N-Acetylglucosaminidase
LytC	1,4- β -N-Acetylmuramidase
Malp-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MDP	Muramyl-dipeptid
MMR	<i>macrophage mannose receptor</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaIO ₄	Natriumperiodat
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
Oct3/4	<i>octamer binding transcription factor 3/4</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ODN	Oligodesoxynukleotid
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p53	Tumor-Protein p53
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pce	<i>pneumococcal phosphorylcholinesterase</i>
PE	Pronase E
PK	Proteinase K

Ply	Pneumolysin
Poly(I:C)	Polyinosin-polycytidyl Säure
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin
PP3	4-Amino-7-phenylpyrazolol[3,4-d] pyrimidin
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PspA	<i>pneumococcal surface protein A</i>
p-Wert	Signifikanzwert
PYD	Pyrin-Effektordomäne
PYHIN	<i>pyrin- and HIN200-domain-containing</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RIP2	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2</i>
RKI	Robert Koch Institut
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
<i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIGN-R1	<i>specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1</i>
SN	<i>supernatant</i>
Sox2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SP1	<i>specificity protein 1</i>
<i>S.p.Δcps</i>	kapsellose Serotyp 2 Mutante von <i>Streptococcus pneumoniae</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-Aminoethansulfonsäure
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
vs.	versus
WT	Wildtyp
Zym	Zymosan

3. Einleitung

3.1 Pneumonie

Eine Pneumonie beschreibt eine akute oder chronische Entzündung des Lungenparenchyms, welche allergischer, chemischer, physikalischer, zumeist jedoch infektiöser Genese ist [1]. Im Wesentlichen sind hierfür Bakterien und Viren verantwortlich, welche durch Aspiration aus dem Nasopharynx, Inhalation erregerhaltiger Tröpfchen oder seltener hämatogen in die Lunge gelangen [1]. Die Schädigung des Lungenparenchyms wird sowohl durch die Vermehrung der Mikroben im alveolären Kompartiment als auch durch die dadurch induzierte Immunantwort verursacht [2]. Eine wichtige Rolle bei dieser Immunantwort spielen Alveolarmakrophagen, welche die eingedrungenen Erreger phagozytieren, abtöten und eine inflammatorische Kaskade in Gang setzen [2]. Durch freigesetzte Chemokine werden neutrophile Granulozyten rekrutiert [3]. Die inflammatorische Antwort ist mitverantwortlich für die klinische Symptomatik der Pneumonie, wie Fieber u.a. induziert durch Tumornekrosefaktor- α (TNF α), oder purulentes Sputum durch zerfallende neutrophile Granulozyten [1]. Die Pneumonie ist weltweit die Infektionserkrankung mit der höchsten Anzahl an Todesopfern [4]. In Hinblick auf das zu erwartende Erregerspektrum ist eine Einteilung in ambulant erworbene Pneumonien (engl. „*community-acquired pneumonia*“, CAP) und nosokomial erworbene Pneumonien (engl. „*hospital-acquired pneumonia*“, HAP) sinnvoll [1]. Ambulant erworbene Pneumonien werden zu 30% und damit in erster Linie durch *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) verursacht und gehen mit einer Sterblichkeit von ca. 14% einher [5], welche trotz aller medizinischen Fortschritte seit mehr als 50 Jahren nahezu unverändert hoch ist [6, 7]. Das Erregerspektrum nosokomial erworbener Pneumonien verschiebt sich in Richtung schwierig therapierbarer Keime wie *Pseudomonas aeruginosa* oder hochresistente gramnegative Erreger [8], was mitursächlich für die hohe Mortalität der HAP von bis zu 33-50% ist [9].

3.1.1 Pneumokokkenpneumonie

Streptococcus pneumoniae ist der Haupterreger der ambulant erworbenen Pneumonie, welche jährlich weltweit geschätzte 1,2 Millionen Todesopfer fordert [10]. Die höchste Inzidenz schwerer, oft systemisch verlaufender Pneumokokkeninfektionen ist bei Kindern vor dem 5. Lebensjahr und bei älteren Patienten über 65 Jahren zu verzeichnen [11]. Als Ursache dafür wird bei Kindern u.a. eine verminderte Immunogenität der Pneumokokken diskutiert, die

aufgrund der dicken Polysaccharidkapsel und des noch unreifen kindlichen Immunsystems eine insuffiziente humorale Immunantwort induzieren [11]. Bei älteren Patienten steigt mit zunehmendem Alter die Häufigkeit von Begleiterkrankungen wie Herz- oder Niereninsuffizienz, welche schwere Krankheitsverläufe begünstigen [12]. Auch wenn die Kausationskette für die Entstehung einer Pneumokokkenpneumonie bislang nicht abschließend geklärt werden konnte, wird als Ausgangspunkt die Besiedlung des Nasopharynx mit einem Stamm von *Streptococcus pneumoniae* angenommen [13]. Gerade bei Kindern werden jedoch asymptomatische Kolonisierungen von mehreren Monaten beobachtet [14], welche nur zu einem vergleichsweise geringen Prozentsatz zu einer manifesten Pneumonie führen [10]. Schätzungsweise 10% aller Erwachsenen und 20-40% aller Kinder sind asymptomatische Träger von Pneumokokken im oberen Nasopharynx [14]. Wahrscheinlich gelangen die Erreger hauptsächlich durch Aspiration in die Lunge [13]. Abhängig von Faktoren wie der Virulenz des infizierenden Serotyps und der Abwehrlage des Wirts kann es zur Ausbildung einer Pneumonie kommen [13]. Eine verminderte mukoziliäre Reinigung, ein Immunglobulin A (IgA)-Mangel, Epithelschäden durch Rauchen oder eine vorausgegangene Virusinfektion wirken begünstigend [11, 13, 15]. Das klinische Bild der Pneumokokkenpneumonie reicht von geringfügiger Symptomatik bis hin zu fulminant tödlichen Verläufen [1]. Häufige Symptome sind plötzlich einsetzendes Fieber mit Schüttelfrost, produktivem Husten, Dyspnoe, Thoraxschmerzen bei Pleurabeteiligung und stark reduziertem Allgemeinbefinden [1]. Zur Initialdiagnostik gehört die Bestimmung der Vitalparameter, die Anfertigung einer Röntgen-Thorax Aufnahme in zwei Ebenen, die Bestimmung der Entzündungs- (Leukozytenzahl, CRP-Wert) und Retentionsparameter (Kreatinin-Wert, glomeruläre Filtrationsrate) und die Abnahme von Blut- und Sputumkulturen vor Beginn einer Antibiotikatherapie [16]. Vor allem für antibiotisch vorbehandelte Patienten oder bei erschwerten Bedingungen für eine Sputumgewinnung ist der Nachweis des Kapselpolysaccharides von *Streptococcus pneumoniae* im Urin eine sinnvolle diagnostische Option [14]. Diese Methode ist insbesondere bei bakteriämischen Krankheitsverläufen sehr sensitiv [14]. Zur Einschätzung des Schweregrades und der Notwendigkeit einer stationären Behandlung dient u.a. der CRB-65 Score [17].

Die Wahl des initialen Antibiotikums richtet sich nach dem klinischen Schweregrad der Pneumonie sowie den Komorbiditäten des Patienten und reicht von einem oralen Aminopenicillinpräparat (bzw. Fluorchinolon bei Penicillinallergie) bei leichten Fällen bis zu einem intravenösen β -Lactam Präparat mit breitem Spektrum (wie Piperacillin/Tazobactam) in Kombination mit einem Makrolid bei schweren Pneumonien [16]. Nach Einleitung einer

empirischen Antibiotikatherapie sollte nach Möglichkeit eine Resistenztestung des kausalen Pneumokokkenstammes auf gängige Antibiotika erfolgen und die antibiotische Medikation entsprechend angepasst werden [18]. Zunehmende Antibiotikaresistenzen stellen ein ernstzunehmendes Problem dar. Die Prävalenz penicillinresistenter Stämme in Europa ist länderabhängig: 25-50% in Spanien, Frankreich und Griechenland, 10-25% in Portugal, Irland und Finnland sowie 1-5% in England, Deutschland, Österreich, Schweden und Norwegen [19]. Resistenzraten für Makrolide variieren ebenfalls: 25-50% in Frankreich, Italien und Griechenland, 10-25% in Spanien, Portugal, England, Deutschland, Norwegen und Finnland sowie 1-5% in Schweden [19]. Auch die Wirksamkeit des gängigen 23-valenten Impfstoffes gegen Pneumokokken ist insbesondere bei älteren Patienten mit chronischen Erkrankungen nicht suffizient [20]. Speziell für Kinder unter 2 Jahren entwickelte Konjugatimpfstoffe senken deutlich die Rate invasiver Pneumokokkeninfektionen, decken jedoch nur maximal 13 der mehr als 90 Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* ab und sind zudem sehr teuer [21]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, durch ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Pneumokokkenpneumonie neue Behandlungsmöglichkeiten zu erschließen.

3.2 Pneumokokken

Streptococcus pneumoniae ist ein lanzettförmiges, fakultativ anaerobes, grampositives Bakterium, welches sich paarweise oder in kurzen Ketten zusammenlagert [15]. Humanpathogene Bedeutung hat es als Erreger der Pneumonie mit häufig bakteriämischen Verläufen, Meningitis, Otitis media und Sinusitis [22]. Das von den Pneumokokken produzierte Pneumolysin ist ursächlich für das vergrünende, α -hämolyisierende Wachstumsverhalten auf Blutagar [11]. Zurzeit sind mehr als 90 verschiedene Kapselserotypen bekannt, welche sich in geografischer Verteilung, Pathogenität und Altersprävalenz unterscheiden [13]. Durch die Fähigkeit der Pneumokokken, kapselkodierende Genabschnitte auszutauschen, ist der Serotyp einer ständigen Plastizität unterworfen [13].

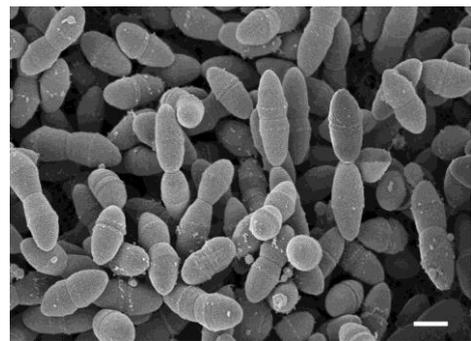


Abbildung 1:
Elektronenmikroskopische Aufnahme
von *Streptococcus pneumoniae*

Balken = 500 nm; Quelle: RKI [23]

3.2.1 Virulenzfaktoren der Pneumokokken

Streptococcus pneumoniae verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, deren individuelle krankheitsfördernde Bedeutung von der anatomischen Lokalisation des Erregers im Wirt und dem Stadium der Erkrankung abhängig ist [24]. Die folgende Übersicht fokussiert auf Pneumonie-relevante Mechanismen.

Zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren der Pneumokokken gehört die 200-400 nm dicke Polysaccharidkapsel, welche zumeist kovalent an die Außenseite der Zellwand gebunden ist und die äußerste Hülle der Pneumokokken darstellt [24]. Unbekapselte Stämme sind als weitestgehend avirulent einzuschätzen, obwohl sie oberflächliche Infektionen wie Konjunktividen auslösen können [25]. Die Kapsel erfüllt eine Vielzahl von Funktionen im Krankheitsverlauf. Sie erleichtert den Pneumokokken nach Eintritt in den Nasenrachenraum die Mukusbarriere zu überwinden und somit Zugang zu den Schleimhautepithelzellen zu erlangen [24]. Zur besseren Adhäsion an die Epithelzellen sind die Erreger in der Lage, die Dicke ihrer Kapsel zeitweise deutlich zu reduzieren, was Adhäsionsmoleküle freilegt [26]. Normalerweise sind diese Moleküle zur Verhinderung einer Opsonisierung und Phagozytose durch die Kapsel maskiert [24].

Die Zellwand der Pneumokokken besteht aus einer Dreifachschicht Peptidoglykane, in welche Teichon- und Lipoteichonsäureketten mit Phosphorylcholin-gruppen (ChoP) verankert sind [15]. Im Gegensatz zur Kapsel ist die Zellwand stark immunogen [15].

Pneumokokken besitzen eine Reihe von proteinergen Virulenzfaktoren. Besonders bedeutsam ist die Gruppe der Cholin-bindenden Proteine mit den Hauptvertretern PspA (engl. „*pneumococcal surface protein A*“), CbpA (engl. „*choline-binding protein A*“) und den Autolysinen. Weitere proteinerge Virulenzfaktoren sind das Pneumolysin, die IgA1-Protease, verschiedene Exoglycosidasen (wie die Neuraminidase) und die Hyaluronidase [22, 27].

Der Gruppe der Cholin-bindenden Proteine auf der Oberfläche der Pneumokokken ist gemeinsam, dass sie über ChoP in der Zellwand verankert sind [24]. PspA hemmt die Bindung des Komplementfaktors C3b und damit den alternativen Weg der Komplementaktivierung [28]. CbpA spielt v.a. als Adhäsion an Epithelzellen eine wichtige Rolle und erlaubt ein Andocken an polymere Immunglobulin-Rezeptoren auf sekretorischen Epithelzellen der Mukosa [29]. Die Autolysine zählen zur Familie der Mureinhydrolasen und ermöglichen den Pneumokokken durch Spaltung kovalenter Bindungen der Zellwand eine Selbstaflösung (Autolyse) [30]. *Streptococcus pneumoniae* exprimiert fünf verschiedene Autolysine: LytA (N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase), LytB (Endo- β -N-Acetylglucosaminidase), LytC (1,4- β -N-Acetylmuramidase), Pce (engl. „*pneumococcal*

phosphorylcholinesterase“) und CbpD (engl. „*choline-binding protein D*“) [30, 31]. Autolysine sind bedeutsam für grundsätzliche biologische Vorgänge in Pneumokokken wie Zellwandsynthese oder Zellteilung [30]. Hauptverantwortlich für die eigentliche Autolyse ist LytA [32]. Während der logarithmischen Wachstumsphase der Pneumokokken befindet sich LytA größtenteils im Zytoplasma und akkumuliert erst auf der Zellwand, wenn beispielsweise durch Nährstoffmangel die stationäre Wachstumsphase erreicht wird [32]. Die dann einsetzende Autolyse setzt intrazelluläre Strukturen wie DNA- oder RNA-Moleküle und Zellwandfragmente frei, welche potente Aktivatoren des Immunsystems sind [32]. LytB wird vor allem in der frühen exponentiellen Wachstumsphase exprimiert und ist für die Separation der Tochterzellen im Rahmen der Zellteilung verantwortlich [30]. LytB *knockout* Pneumokokken können sich in der Lunge nicht ausbreiten, da sie in Ketten von mehr als 100 Bakterien wachsen und dadurch stark immobilisiert sind [30]. LytC bewirkt ebenfalls eine Autolyse in der stationären Wachstumsphase mit einem Temperaturoptimum bei 30°C [33]. Es dient vermutlich der Freisetzung von DNA-Molekülen für den horizontalen Genaustausch zwischen Pneumokokken im oberen Respirationstrakt während der Kolonisierungsphase [33]. Pce reguliert die Dichte von ChoP auf der Zellwand, was u.a. eine Bindung des CRP an ChoP erschwert und wahrscheinlich einen Mechanismus der Immunevasion darstellt [34]. CbpD vermittelt den sogenannten „Geschwistermord“: *Streptococcus pneumoniae* ist in der Lage, freie (bakterielle) DNA-Moleküle aufzunehmen und in das eigene Erbgut zu integrieren, um sich seiner Umgebung möglichst optimal anzupassen. Zur Bereitstellung der DNA töten kompetente Pneumokokken einen Teil der Nachbarkolonien, was als „Geschwistermord“ (engl. „*fratricide*“) bezeichnet wird [31].

Durch Autolyse wird auch das Exotoxin Pneumolysin (Ply) freigesetzt [15, 35]. In niedriger Konzentration und somit v.a. im Anfangsstadium einer Infektion wirkt es hemmend auf den Zilienschlag des Bronchialepithels und vermindert den Pneumokokkenabtransport aus der Lunge [36]. Zudem induziert es einerseits eine Immunantwort durch Komplementaktivierung und Stimulation der Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und Interleukin (IL) 1 β durch Makrophagen, andererseits inhibiert es die Funktion neutrophiler Granulozyten [35]. In hohen Konzentrationen lagert es sich auf Wirtszellmembranen zu Poren zusammen und wirkt direkt zytotoxisch auf Epithel- und Immunzellen [15].

Immunglobulin-A1 (IgA1) ist mit einem Anteil von mehr als 90% am Gesamt-IgA der Schleimhautbarriere im Nasenrachenraum und Bronchialsystem ein wichtiger Baustein der ersten Verteidigungslinie gegen eindringende Erreger. Diese umgeht *Streptococcus pneumoniae* u.a. durch Bildung einer IgA1-Protease, was ihm eine Vermehrung im Mukus der

Schleimhäute ermöglicht [24]. Mit Hilfe von Exoglykosidasen wie der Neuraminidase spalten Pneumokokken terminale Kohlenhydratketten von Glykoproteinen beispielsweise auf der Oberfläche von Epithelzellen ab. Damit demaskieren sie wahrscheinlich Adhäsionsmoleküle und setzen zudem Nährstoffe frei [24]. Die Expression einer Hyaluronidase zur Spaltung extrazellulärer Matrixbestandteile erleichtert das Eindringen in Wirtsgewebe [22].

3.3 Immunsystem

Alle lebenden Organismen haben Strategien zum Schutz vor Infektionen entwickelt. Die Gesamtheit dieser Strategien wird bei höheren Lebewesen als Immunsystem bezeichnet [37]. Das humane Immunsystem wird in einen angeborenen und einen erworbenen Teil untergliedert, welche eng miteinander verzahnt sind [38]. Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem umfasst eine Reihe von Elementen, welche die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Erreger bilden [38, 39]. Von zentraler Bedeutung sind dabei Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen, welche mittels mustererkennender Rezeptoren (engl. „*pattern recognition receptors*“, PRRs) zwischen fremd und nicht fremd (körpereigen) unterscheiden und eine schnelle, aber unspezifische Immunantwort einleiten [40, 41]. Die Wirksamkeit dieser Immunantwort wird durch erhebliche Kollateralschäden an körpereigenem Gewebe limitiert [42].

Das erworbene Immunsystem ist eine verhältnismäßig junge Errungenschaft der Wirbeltiere und wird insbesondere durch T- und B-Zellen vermittelt [38]. Seine Aktivierung erfolgt durch antigenpräsentierende Phagozyten des angeborenen Immunsystems in Lymphknoten oder Milz über hochspezifische T-/B-Zellrezeptoren [39]. Nach Selektion und mehrtägiger Expansion sowie Reifung der spezifischen T-/B-Zellklone ermöglichen diese durch eine antigenfokussierte Steuerung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems bzw. eine Antikörperbildung eine effiziente Erregerabwehr bei gleichzeitiger Minimierung von Kollateralschäden sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses [38, 42]. Das erworbene Immunsystem spielt jedoch auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Allergien, Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßungen [43].

Da sich die vorliegende Arbeit mit Mechanismen der angeborenen Immunität beschäftigt, wird deren Darstellung im folgenden Kapitel vertieft.

3.3.1 Elemente der angeborenen Immunantwort

Das angeborene Immunsystem bildet keine einheitliche Entität, sondern besteht aus verschiedenartigen, sich teilweise wechselseitig beeinflussenden Subsystemen mit unterschiedlichen Teilfunktionen in der Erregerabwehr [38, 39].

Das Epithel der Haut und Schleimhaut dient als mechanische Barriere für eindringende Pathogene und bildet antimikrobiell wirksame Peptide wie Lysozyme, Cathelicidine und β -Defensine, welche zum Teil auch als Chemokine für Granulozyten, dendritische Zellen und Mastzellen fungieren [44]. In der Lunge sondert das Epithel zusätzlich eine durch Flimmerhärchen kontinuierlich abtransportierte und erneuerte Mukusschicht ab, in der sich inhalierte Partikel und Erreger verfangen [38].

Weitere Bausteine der angeborenen Immunität stellen Akute-Phase-Proteine und die Faktoren des Komplementsystems dar. Akute-Phase-Proteine wie CRP (engl. „*C-reactive protein*“) werden in der Leber vor allem in der Frühphase einer Infektion als Antwort auf proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder IL-1 β gebildet. Sie agieren als Opsonine der eindringenden Pathogene und aktivieren u.a. das Komplementsystem [45]. Dieses wirkt ebenfalls opsonisierend, chemotaktisch auf Makrophagen und durch die Bildung von Membranangriffskomplexen selbst antimikrobiell [39].

Eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem nehmen die Phagozyten, speziell die Makrophagen, ein, deren Funktion einer interessanten Plastizität unterliegt. Die Einteilung der Makrophagen in proinflammatorische M1 (engl. „*classically activated macrophages*“) und antiinflammatorische M2 Makrophagen (engl. „*alternatively activated macrophages*“) konnte auf drei Zustandsformen mit fließenden Übergängen und Zwischenstufen erweitert werden (siehe Abbildung 2) [46]. Auch bei dieser Einteilung handelt es sich jedoch um ein theoretisches Konzept, dessen tatsächliche Übertragbarkeit auf das Immunsystem des Menschen noch zu verifizieren ist. Nach dieser neueren Untergliederung stellen die klassisch aktivierten Makrophagen die eigentlichen Effektorzellen der angeborenen Immunantwort dar. Sie phagozytieren und eliminieren opsonisierte Erreger, bilden toxische Sauerstoff- und Stickstoffradikale, aktivieren als antigenpräsentierende Zellen die erworbene Immunantwort und bilden proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder IL-8 [46]. Diese antimikrobielle Reaktion ist jedoch unter Umständen auch toxisch für körpereigenes Gewebe und an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten beteiligt [47, 48]. Die wundheilenden Makrophagen (engl. „*wound-healing macrophages*“) bilden extrazelluläre Matrix und wirken wie die regulatorischen Makrophagen (engl. „*regulatory macrophages*“) eher unterdrückend auf die Entzündungsreaktion, letztere durch Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [46].

Dies trägt dazu bei, entzündungsbedingte Schäden an körpereigenem Gewebe einzudämmen bzw. zu reparieren. Die Entscheidung, welche Zustandsform ein Makrophage einnimmt, erfolgt durch endogene Stimuli sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems sowie der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse [46, 49]. Stress führt z.B. zur Ausschüttung von Glukokortikoiden, was regulatorische Makrophagen induziert und damit das Immunsystem schwächt [49].

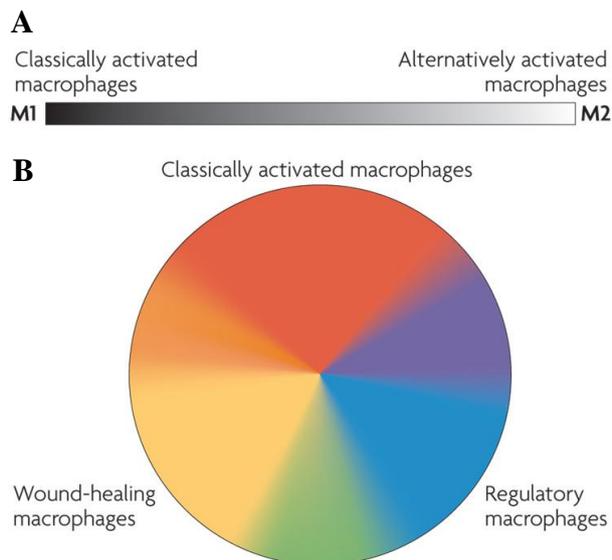


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die Makrophagensubpopulationen

Die zweidimensionale Einteilung in M1 und M2 Makrophagen (A) wurde auf drei Populationen mit Zwischenstufen erweitert (B). Rot repräsentiert die klassisch aktivierten, Gelb die wundheilenden und Blau die regulatorischen Makrophagen. Sekundärfarben wie Grün symbolisieren Zwischenstufen wie Tumor-assoziierte Makrophagen, welche sowohl Charakteristika der wundheilenden als auch der klassisch aktivierten Makrophagen zeigen [46].
Quelle: modifiziert nach Mosser et al. [46]

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind ein weiteres zelluläres Element des angeborenen Immunsystems. Sie sind auf die Abwehr intrazellulärer Erreger wie Viren spezialisiert und induzieren eine Apoptose von befallenen Körperzellen [39]. Zudem produzieren sie vor allem in der Frühphase einer Infektion Interferon (IFN) γ , welches Makrophagen in eine proinflammatorische (klassisch aktivierte) Zustandsform versetzt [46].

Auch eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie dienen insbesondere als Schutzschild gegen mehrzellige Parasiten wie Würmer [39]. Die neutrophilen Granulozyten bilden die zahlenmäßig größte zelluläre Gruppe des angeborenen Immunsystems [43]. Sie wandern aus der Blutbahn in Entzündungsherde ein und phagozytieren bzw. eliminieren extrazelluläre Erreger. Zerfallende neutrophile Granulozyten stellen den Hauptbestandteil des Eiters dar [43].

3.3.2 Mustererkennende Rezeptoren

Zu den grundsätzlichen Aufgaben des angeborenen Immunsystems zählt die Erkennung pathogener Erreger und deren Unterscheidung von körpereigenem Gewebe bzw. harmlosen Kommensalen. Diese Aufgabe ist ebenso bedeutsam wie schwierig, wenn die schier unendliche Vielfalt und hohe Mutationsrate pathogener Erreger bedacht wird [50].

Das angeborene Immunsystem bedient sich dafür einer überschaubaren Anzahl keimbahnkodierter Rezeptoren, den sogenannten mustererkennenden Rezeptoren (engl. „*pattern recognition receptors*“, PRRs) [40, 41, 50]. Diese werden von Immunzellen (wie Makrophagen und Dendritischen Zellen) und Nichtimmunzellen (wie Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen) exprimiert, welche zur angeborenen Immunantwort beitragen [40].

Zu den PRRs gehören membranständige Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (engl. „*toll-like receptors*“, TLRs) oder C-Typ-Lektinrezeptoren (engl. „*c-type lectin receptors*“, CLRs) und zytosolische Rezeptoren wie NOD-like Rezeptoren (engl. „*NOD-like receptors*“, NLRs), RIG-I-like Rezeptoren (engl. „*RIG-I-like receptors*“, RLRs) und zytosolische DNA-Rezeptoren [40, 51]. Ihre Stimulation führt u.a. zur Bildung von Zytokinen und Chemokinen, welche die Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems steuern [38, 40].

PRRs erkennen sowohl pathogenspezifische Strukturen (engl. „*pathogen-associated molecular patterns*“, PAMPs) als auch Moleküle, die von beschädigten körpereigenen Zellen freigesetzt werden (engl. „*damage-associated molecular patterns*“, DAMPs) [40]. PAMPs sind ideale mikrobielle Erkennungsstrukturen, weil sie drei grundsätzliche Eigenschaften erfüllen: Erstens werden sie nur von Mikroben und nicht von Wirtszellen gebildet. Dies erlaubt eine Unterscheidung in fremd und körpereigen. Zweitens werden sie von allen Vertretern einer bestimmten Klasse von Mikroorganismen unverändert exprimiert. Das ermöglicht einer begrenzten Zahl von PRRs praktisch jeden Erreger zu erkennen. Lipopolysaccharid (LPS) ist beispielsweise auf allen gramnegativen Bakterien nachweisbar. Somit kann ein PRR, der LPS erkennt, prinzipiell alle gramnegativen Bakterien erkennen. Drittens sind PAMPs essentiell für das Überleben der Erreger und können daher nur sehr begrenzt durch Mutationen verändert werden und sich der Immunerkennung entziehen [50, 52]. Doch nicht jeder Mikroorganismus ist obwohl „fremd“ auch gefährlich (z.B. nützliche Kommensalen des oberen Respirations- oder Magen-Darm-Traktes) und nicht alles „körpereigene“ ist harmlos (z.B. mutiertes, entartetes Gewebe) [53]. Matzinger et al. entwickelten auf Basis dieser Überlegung das sogenannte „Gefahrenmodell“ (engl. „*danger-model*“). Demnach werden die PRRs des angeborenen Immunsystems auch durch DAMPs aktiviert, welche von gestressten oder traumatisierten Zellen freigesetzt werden und dem

Körper Gefahr signalisieren [53]. Wichtige DAMPs sind DNA- oder RNA-Fragmente, Hitzeschockproteine oder Bruchstücke von Hyaluronan [53, 54].

Überdies sind die Zellen des angeborenen Immunsystems mithilfe einiger PRRs in der Lage, tote von lebendigen Erregern zu unterscheiden [55]. Auch tote Erreger sind „fremd“, aber nur lebendige Erreger sind pathogen und rechtfertigen eine volle Immunantwort. Diese Unterscheidung gelingt durch Erkennung von „vita-PAMPs“ wie freier bakterieller mRNA (engl. „*messenger RNA*“), einem Merkmal lebendiger Bakterien [55].

Die verschiedenen Klassen der PRRs sollen nun im Einzelnen vorgestellt werden.

3.3.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die Familie der Toll-like Rezeptoren gehört zu den am besten untersuchten PRRs. Bisher konnten 10 humane und 12 murine TLRs identifiziert werden [40, 56, 57]. Die TLRs 1 bis 9 sind dabei interspeziell funktionell ähnlich, TLR10 wird nur von Menschen und TLR 11 bis 13 nur von Mäusen exprimiert [56].

TLRs sind transmembranöse Glykoproteine, bestehend aus einer N-terminalen Leucin-reichen Liganden-Bindungsregion und einer Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, welche der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege dient [40]. Die verschiedenen TLRs unterscheiden sich im Hinblick auf die von ihnen erkannten PAMPs bzw. DAMPs, aktivierte Signalwege und ihre Lokalisation. Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11 werden primär auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen extrazelluläre PAMPs von Bakterien, Pilzen und Protozoen, wohingegen die TLRs 3, 7, 8 und 9 endolysosomal hauptsächlich bakterielle, virale und eukaryotische Nukleinsäuren detektieren [40, 56]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Korezeptoren und Liganden der TLRs.

Tabelle 1: Übersicht über TLRs, Korezeptoren und Liganden

TLR	Korezeptor	Hauptligand(en)	Quelle
TLR1	TLR2	Bakterielle triacetylierte Lipoproteine	[40]
TLR2	Dectin-1	Lipoteichonsäure grampos. Bakterien, virale/parasitäre/fungale Oberflächenstrukturen	[40]
TLR3	-	Virale dsRNA (engl. „ <i>double-stranded RNA</i> “)	[40]
TLR4	MD2, CD14	LPS gramneg. Bakterien, virale Hüllproteine, Pneumolysin von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	[56]
TLR5	-	Flagellin	[56]
TLR6	TLR2	Bakterielle diacetylierte Lipoproteine	[40]

TLR7	-	Virale und bakterielle ssRNA (eng. „ <i>single-stranded RNA</i> “)	[40]
TLR8	-	Virale und bakterielle ssRNA	[40]
TLR9	-	Bakterielle, virale, eukaryotische DNA, Hemozoin	[57, 58]
TLR10	TLR2	Unbekannt	[59]
TLR11	TLR12	Uropathogene Bakterien, Profilin	[56, 60]
TLR12	TLR11	Profilin	[60]
TLR13	Unbekannt	Bakterielle ribosomale RNA (23S rRNA)	[61]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit spielt TLR9 eine wichtige Rolle. Nach Rekrutierung vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird TLR9 im Endolysosom durch Proteasen wie Cathepsin B, K und L und Asparagin-Endopeptidase prozessiert und steht anschließend für eine Ligandenbindung zur Verfügung [40]. Das Paradigma, TLR9 könne nur durch bakterielle oder virale unmethylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotidsequenzen (CpG) aktiviert werden [62], wird aktuell in Frage gestellt. Auch freie körpereigene DNA scheint TLR9 zu aktivieren [63]. Die endolysosomale Lokalisation von TLR9 und das Vorhandensein extrazellulärer DNasen verhindern jedoch einen direkten Kontakt [57]. Kommt es allerdings zu ausgedehnten nekrotischen Zellschäden, kann eukaryotische DNA u.a. im Komplex mit dem ebenfalls bei Nekrose freiwerdenden HMGB1 (engl. "*high-mobility-group-protein B1*") über RAGE (engl. "*receptor for advanced glycation endproducts*") in das endolysosomale Kompartiment gelangen und über TLR9 als DAMP eine Immunantwort induzieren [57, 64].

Nach Bindung der TLRs an ihre Liganden kommt es zumeist zu einer Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit Korezeptoren (siehe Tabelle 1), was die Anlagerung von Adaptermolekülen wie MyD88 (engl. "*myeloid differentiation primary response gene 88*") oder TRIF (engl. "*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ") an die TIR-Domäne und die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege ermöglicht [56]. MyD88 ist essenziell für alle TLRs, mit Ausnahme von TLR3, welcher hauptsächlich von TRIF abhängt [40]. Für TLR4 und TLR9 ist jeweils ein MyD88- und ein TRIF-abhängiger Signalweg beschrieben [40, 65]. Gemeinsame Endstrecke ist die Stimulation von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B (engl. "*nuclear factor- κ B*"), IRF (engl. "*IFN regulatory factor*") 3/7 oder MAPKs (engl. "*mitogen-activated protein kinases*") [40]. Dies führt u.a. zur Bildung von Zytokinen, Chemokinen bzw. Typ 1 Interferonen sowie einer gesteigerten Expression von Genen, welche der Erregerabwehr, Stoffwechselkontrolle, Gewebereparatur oder der Regulation der TLR-Signaltransduktion selbst dienen [40]. Dabei birgt eine überschießende

oder inadäquate TLR-Aktivierung stets die Gefahr einer unter Umständen bedrohlichen, systemischen Entzündungs- oder Autoimmunreaktion [66].

3.3.2.2 C-Typ Lektinrezeptoren (CLRs)

CLRs sind eine Klasse von membranständigen PRRs, die hauptsächlich von Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert werden und Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Viren, Bakterien und Pilzen erkennen [40]. Vertreter wie Dectin-1, Dectin-2 oder MINCLE werden durch fungale PAMPs stimuliert und induzieren die Bildung proinflammatorischer Zytokine bzw. regulieren TLR-Signalwege [40]. Eine Aktivierung von SIGN-R1 (engl. „*specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1*“) oder des Mannose-Rezeptors MMR (engl. "*macrophage mannose receptor*") löst eine Phagozytose des erkannten Bakteriums oder Pilzorganismus aus [41].

3.3.2.3 NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Die Familie der NLRs gehört zu den zytoplasmatisch lokalisierten PRRs. Es sind bisher 23 humane und 34 murine Vertreter bekannt [56]. Sie initiieren eine Immunantwort gegen Mikroorganismen, die entweder selbst oder deren Bestandteile ins Zytoplasma eindringen [56]. Dies kann direkt unter Umgehung extrazellulärer PRRs beispielsweise mittels porenbildender Exotoxine oder indirekt durch Ausbrechen aus Endolysosomen nach Phagozytose erfolgen [67, 68]. Gemeinsames strukturelles Merkmal der NLRs ist ein dreigliedriger Aufbau [67]. Eine C-terminale, variable, Leucin-reiche Domäne dient der Erkennung von PAMPs und DAMPs [56]. Die zentrale Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD) vermittelt eine ligandeninduzierte Oligomerisierung zur Bildung von aktivierten Rezeptorkomplexen [67]. Verschiedene N-terminale Effektor-domänen aktivieren nachgeschaltete Signalwege und ermöglichen eine Subklassifizierung der NLRs mit jeweils unterschiedlichen Funktionen [56, 67].

Die NLRs NOD1 und NOD2 verfügen N-terminal über eine bzw. zwei Caspase-rekrutierende Effektor-domäne(n) (CARD) [56]. Sie erkennen Zellwandbestandteile gramnegativer (NOD1) bzw. grampositiver und gramnegativer (NOD2) Bakterien [67]. CARD aktiviert über das Adapterprotein RIP2 (engl. „*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2*“) einen Signalweg, der hauptsächlich synergistisch zur Signalkaskade der TLRs NF- κ B und MAP-Kinasen induziert [67]. Dies führt u.a. zur Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8 oder TNF α [67].

NLRs wie NLRP1, NLRP3 und NLRC4 lagern sich nach Aktivierung über eine Pyrin-Effektordomäne (PYD) bzw. über CARD (NLRC4) mit dem zentralen Adapterprotein ASC (engl. „*apoptosis-associated speck-like protein*“) zu großen, multimeren Proteinkomplexen zusammen, den sogenannten Inflammasomen [56, 68]. Diese steuern die Bildung der Zytokine IL-1 β und IL-18 und können eine Sonderform des programmierten Zelltodes einleiten, welche Pyroptose genannt wird und v.a. eine Ausbreitung intrazellulärer Erreger eindämmen soll [67]. Aktiviert werden Inflammasome über PAMPs wie LPS, DAMPs wie Hitzeschockproteine oder Umweltgifte wie Asbest [56, 69].

3.3.2.4 RIG-I-like Rezeptoren (RLRs)

RLRs bilden eine weitere Familie zytoplasmatisch lokalisierter PRRs. Wichtige Vertreter sind RIG-I (engl. „*retinoic acid-inducible gene 1*“), MDA5 (engl. „*melanoma differentiation-associated protein 5*“) und LPG2 (engl. „*laboratory of genetics and physiology 2*“) [40]. Sie erkennen vorrangig virale RNA-Moleküle und initiieren die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Typ 1 Interferonen [40].

3.3.2.5 Zytoplasmatische DNA-Rezeptoren

Freie mikrobielle bzw. körpereigene DNA induziert als PAMP bzw. DAMP eine starke Immunantwort [51, 70]. Neben TLR9 existiert eine Reihe weiterer (zytosolisch lokalisierter) DNA-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.

AIM2 (engl. „*absent in melanoma 2*“) ist ein DNA-Sensor aus der PYHIN (engl. „*pyrin- and HIN200-domain-containing*“) Proteinfamilie, der nach Aktivierung an ASC koppelt und Inflammasome bildet [51, 56]. Neben ASC ist STING (engl. „*stimulator of interferon genes*“) ein weiteres wichtiges Adapterprotein der DNA-Erkennung. Es ist in Signalwege von DNA-Rezeptoren wie der Helikase DDX41 oder des PYHIN Proteins IFI16 (engl. „*gamma-interferon-inducible protein 116*“) und wahrscheinlich auch noch weiterer, bisher unbekannter DNA-Rezeptoren verschaltet [71].

Zahlreiche DNA Erkennungssysteme induzieren eine Typ 1 Interferon Bildung: Darunter DAI (engl. „*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*“) über IRF 3/7 [72], die Helikasen DHX9 und DHX36 über MyD88 [71] und Lrrfip1 (engl. „*leucine-rich repeat (in flightless I) interacting protein-1*“), welches sowohl DNA als auch RNA erkennt [51]. Zudem können zytoplasmatische DNA-Fragmente mithilfe der RNA Polymerase III in RNA transkribiert werden, welche anschließend u.a. von RLRs detektiert wird [56].

3.3.3 Erkennung der Pneumokokken durch das angeborene Immunsystem

Streptococcus pneumoniae wird durch verschiedene Elemente des angeborenen Immunsystems erkannt. PRRs spielen dabei eine zentrale Rolle: TLR2 auf Immunzellen wie Makrophagen erkennt, teilweise in Interaktion mit TLR1 und TLR6, Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan und Teichonsäureketten auf der Oberfläche der Pneumokokken [73, 74]. TLR4 wird wahrscheinlich durch das Exotoxin Pneumolysin aktiviert [75]. Freie bakterielle Nukleinsäuren werden durch TLR9 (DNA) und TLR7/8 (RNA) detektiert [73, 76]. Darüber hinaus erfolgt eine Erkennung von bakterieller DNA durch Makrophagen über AIM2, DAI und mutmaßlich weitere, noch unbekannte intrazelluläre DNA-Rezeptoren [77]. Diese Erkennung setzt eine Internalisierung der DNA-Moleküle z.B. über Phagozytose oder Pneumolysin voraus [77, 78]. Die Phagozytose ganzer Pneumokokken wird u.a. durch den Scavenger-Rezeptor MARCO (engl. „*macrophage receptor with collagenous structure*“) auf der Oberfläche von Makrophagen sowie CLRn wie SIGN-R1 vermittelt [73, 79]. Nach Phagozytose und Verdau im Endolysosom gelangen Peptidoglykanfragmente der Zellwand wahrscheinlich über Pneumolysin-induzierte Poren ins Zytosol und aktivieren NOD2 [77]. Pneumolysin aktiviert darüber hinaus direkt das NLRP3 Inflammasom [69].

Auch lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems sind an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* beteiligt. Akute Phase Proteine wie CRP und Antikörper des erworbenen Immunsystems binden an Oberflächenstrukturen der Pneumokokken und aktivieren das Komplementsystem [73]. Surfactant Proteine und antimikrobielle Peptide der Mukosa wirken direkt zytotoxisch und mobilisieren zelluläre Bestandteile der angeborenen Immunantwort [14, 73].

3.4 Krüppel-like Faktoren

Krüppel-like Faktoren (engl. „*krueppel-like factors*“, KLFs) sind Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Zinkfingerproteine [80]. Ihr Name beruht auf einer Homologie zum Segmentierungsprotein Krüppel von *Drosophila melanogaster*, dessen homozygoter Verlust zur Geburt von schwer missgebildeten Fliegen führt [81]. KLFs sind an der Steuerung grundlegender Zellfunktionen wie Zellteilung, Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Reaktion auf Zellstress beteiligt [80]. Beim Menschen sind 17 Vertreter bekannt. Gemeinsames strukturelles Merkmal ist eine C-terminale, hochkonservierte DNA-Bindungsregion [80, 82]. Sie besteht aus drei Cys₂His₂ Zinkfingerschleifen, die an Guanin-Cytosin reiche Promotersequenzen binden [82]. Die N-terminale Region enthält u.a. die Start-

Domäne und ist im Gegensatz zum C-Terminus sehr variabel [82]. Abhängig vom gebundenen Promoter, dem Aufbau des N-Terminus und spezifischen Interaktionspartnern können KLFs die Transkription ihrer Zielproteine hemmen, aktivieren oder auch beides [80].

3.4.1 Krüppel-like Faktor 4

Krüppel-like Faktor 4 (engl. „*krueppel-like factor 4*“, KLF4) wurde erstmals 1996 im Epithel der Haut und der Schleimhaut des Darms entdeckt und zunächst als epithelialer Zinkfinger (engl. „*epithelial zinc finger*“, EZF) bzw. darmangereicherter KLF (engl. „*gut enriched krueppel like factor*“, GKLF) bezeichnet [83]. Er hat eine fundamentale Bedeutung für die Entwicklung einer funktionierenden Epithelbarriere. Die KLF4 *knockout* Maus verstirbt bereits wenige Tage nach der Geburt an Exsikkose durch Flüssigkeitsverlust über die Haut [84]. Der Name KLF4 setzte sich endgültig durch, nachdem KLF4 in einer Vielzahl weiterer Gewebe nachgewiesen wurde, u.a. Lunge, Hoden, Herz, Kornea, Knochenmark und Immunzellen [83, 85]. KLF4 wird v.a. von postmitotischen, ausdifferenzierten Zellen exprimiert und kontrolliert die Transkription von Genen welche Differenzierung und Zellzyklus steuern [83]. Dabei kann KLF4 die Transkription seiner Zielgene sowohl hemmen als auch aktivieren [83]. Wird die DNA einer Zelle irreparabel beschädigt oder erhält die Zelle über Zytokine oder Kontaktinhibierung das Signal zum Zellteilungsstopp, steigert KLF4 zusammen mit dem Transkriptionsfaktor p53 die Expression von p21, einem Inhibitor des Zellzyklus, und hemmt gleichzeitig die Expression des Zellzyklusaktivators Cyclin-D1 [86, 87]. Dabei kommt es zur Zyklusblockade in der G1/S-Phase [88]. Darüber hinaus hemmt KLF4 über BAX (engl. „*Bcl-2-associated X protein*“) die Einleitung einer Apoptose [88-90]. Aufgrund seiner regulatorischen Funktion im Zellzyklus spielt KLF4 sowohl als Tumorsuppressor (z.B. Kolorektales Karzinom, Bronchialkarzinom) als auch Onkogen (z.B. Mammakarzinom) eine wichtige Rolle in der Karzinomentstehung [83].

Hohen Bekanntheitsgrad erlangte KLF4 durch die Entdeckung, dass er zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2 und c-Myc ausdifferenzierte Zellen in pluripotente Stammzellen zurücktransformieren kann [91, 92]. Für die Beschreibung dieses Phänomens wurden Yamanaka und Gurdon im Jahr 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Kontrovers wird die Rolle von KLF4 im Entzündungsgeschehen diskutiert, v.a. in Monozyten/Makrophagen. Feinberg et al. und Alder et al. zeigten, dass KLF4 für die Umwandlung hämatopoetischer Progenitorzellen in Monozyten und die Ausdifferenzierung der Monozyten in Gewebsmakrophagen grundlegend wichtig ist [85, 93]. Monozyten mit

einem *knockout* von KLF4 exprimieren weniger Adhäsionsmoleküle für die Einwanderung in Entzündungsherde und gehen schneller in Apoptose [85]. Die Expression von KLF4 in Makrophagen wird wahrscheinlich durch proinflammatorische Stimuli wie TNF α , INF γ oder LPS verstärkt [94]. Feinberg et al. beobachteten, dass KLF4 in J774A.1 und RAW264.7 Makrophagen die Bildung der Stickstoffmonoxid-Synthase (engl. „*inducible nitric oxide synthase*“, iNOS) steigert, einem Marker für klassisch aktivierte bzw. M1 Makrophagen [94]. Auch Liu et al. beobachteten eine Induktion von KLF4 in RAW264.7 Makrophagen nach Stimulation mit LPS [95]. KLF4 förderte in dieser Studie jedoch die Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, einem Kennzeichen von regulatorischen bzw. M2 Makrophagen [95]. Liao et al. bestätigten diese Beobachtung und schrieben KLF4 ebenfalls eine antiinflammatorische Funktion in Makrophagen zu [96]. KLF4 *knockout* RAW264.7 Makrophagen exprimierten zelluläre Marker für M1 Makrophagen wie iNOS und zeigten eine gesteigerte Bakterizidität [96]. KLF4 scheint also prinzipiell eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen in Makrophagen zu spielen. Ob KLF4 eher anti- und/oder proinflammatorische Signalwege fördert, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Zahlten et al. untersuchten die Funktion von KLF4 in humanen Bronchialepithelzellen bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*. Sie konnten zeigen, dass KLF4 in BEAS-2B Zellen durch freie bakterielle DNA über TLR9, MyD88 und Src-Tyrosinkinase induziert wird und die Bildung von IL-10 fördert [97]. Die Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit Pneumokokken ist unerforscht.

3.5 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe kleiner, löslicher Polypeptide oder Glykoproteine, die ein komplexes Netzwerk zur Regulation von Wachstum und Differenzierung praktisch aller Zelltypen bilden [44, 98]. Sie werden von einer Vielzahl von Immun- und Nichtimmunzellen gebildet und steuern autokrin, parakrin oder systemisch alle Elemente der angeborenen und erworbenen Immunantwort, inklusive Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen und deren Bildung im Knochenmark [43]. Sie können in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden: Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Chemokine [43].

Interleukine (ILs) sind in erster Linie für die Kommunikation zwischen Leukozyten verantwortlich [99]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist v.a. IL-10 bedeutsam. IL-10 ist ein sehr potentes antiinflammatorisches Zytokin, welches von regulatorischen Makrophagen,

dendritischen Zellen, T-/B-Lymphozyten und Epithelzellen gebildet wird und zur Begrenzung der Immunreaktion beiträgt [97, 100]. Für PRRs wie TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, NOD2 oder Dectin-1 konnte gezeigt werden, dass deren Aktivierung v.a. über den Transkriptionsfaktor NF- κ B die Bildung von IL-10 in Makrophagen steigert [101]. Proinflammatorische Zytokine wie TNF α , deren Sekretion durch IL-10 inhibiert wird, steigern ihrerseits die Bildung von IL-10 im Sinne einer negativen Rückkoppelung der Entzündungsreaktion [98]. Dies birgt unter Umständen auch Risiken für den Wirt. Erreger wie *Streptococcus pneumoniae* induzieren eine starke IL-10 Bildung, was möglicherweise dazu beiträgt, das Immunsystem des Wirtes in einen anergen Zustand zu versetzen und damit Persistenz und Ausbreitung der Erreger begünstigt [97, 100]. Patienten, die an einer Pneumokokkenpneumonie versterben, haben im Vergleich zu Überlebenden zumeist deutlich höhere Serumspiegel von IL-10 [102].

Die Zytokinklasse der Interferone (IFNs) wird in Typ 1 (IFN α , IFN β) und Typ 2 (IFN γ) untergliedert und dient primär der Abwehr von Viren [43]. Die Rolle der Typ 1 IFNs bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen ist ein verhältnismäßig junges Forschungsfeld. Pneumokokken induzieren über NOD2 und zytosolische DNA-Rezeptoren die Bildung von Typ 1 IFNs in Makrophagen und Lungenepithelzellen [77]. Typ 1 IFNs regulieren auto- und parakrin über den Interferon- α/β Rezeptor (IFNAR) die Expression von IFN-stimulierten Genen (engl. „*IFN-stimulated genes*“, ISGs) [103]. IFNAR wird relativ breit von Immunzellen (wie Makrophagen) und Nichtimmunzellen exprimiert [103]. ISGs scheinen u.a. für die Feinabstimmung der Interleukinproduktion verantwortlich zu sein [101, 104].

Die Familie der Tumornekrosefaktoren (TNFs) umfasst zwei homologe Proteine, die vorwiegend von Makrophagen (TNF α) bzw. Lymphozyten (TNF β) nach Erkennung von PAMPs oder DAMPs sezerniert werden [98]. TNF α wird v.a. in der Frühphase einer Pneumokokkenpneumonie gebildet, stimuliert die Bildung weiterer hauptsächlich proinflammatorischer Zytokine und aktiviert einwandernde neutrophile Granulozyten [44]. TNF α spielt eine wichtige Rolle im Krankheitsbild der Sepsis. Es fördert u.a. die Durchlässigkeit der Gefäßbarriere, wirkt negativ inotrop am Herzen und kachektogen [98].

Koloniestimulierende Faktoren (engl. „*colony stimulating factors*“, CSFs) und Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin (EPO) werden ebenfalls zu den Zytokinen gezählt und regulieren in erster Linie die Hämatopoese im Knochenmark [99].

Chemokine sind Zytokine, die v.a. in der Frühphase einer Infektion oder unmittelbar nach einer Gewebsverletzung freigesetzt werden und eine gerichtete Chemotaxis von Immunzellen zum Ort der Infektion oder Verletzung initiieren [43]. Abhängig vom Aufbau des N-Terminus werden vier Subfamilien unterschieden, wobei die überwiegende Mehrzahl der Chemokine

der CC-Familie mit zwei benachbarten Cysteinen oder der CXC-Familie mit einer trennenden Aminosäure zwischen den Cysteinen angehört [98]. CXC8 oder IL-8 ist ein wichtiger Vertreter der CXC-Familie und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [105]. *Streptococcus pneumoniae* induziert eine starke Ausschüttung von CXC8, hauptsächlich durch pulmonale Epithelzellen und Makrophagen [106, 107].

3.6 Wissenschaftliche Fragestellung

Obgleich der Pneumokokkenpneumonie weltweit eine große medizinische und gesundheitsökonomische Bedeutung zukommt, sind zugrundeliegende Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität zum Teil noch unverstanden. Die Entschlüsselung dieser Mechanismen könnte nicht nur interessante Einblicke in die Interaktion zwischen Wirt und Erreger liefern, sondern unter Umständen auch bei der Suche nach neuen Therapieoptionen helfen.

Der Transkriptionsfaktor KLF4 wird in Bronchialepithelzellen durch Pneumokokken induziert und fungiert als Regulator der epithelialen Immunantwort [97]. Auch in Makrophagen scheint KLF4 eine wichtige immunregulatorische Rolle zu spielen [85, 93-96]. Die Bedeutung von KLF4 in Makrophagen in der Pneumokokkenpneumonie ist unerforscht. Da Makrophagen zu den wichtigsten Effektorzellen der angeborenen Immunantwort in der Lunge zählen [108], knüpft die vorliegende Arbeit an dieser Stelle an. Im Einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:

1. Induziert *Streptococcus pneumoniae* den Transkriptionsfaktor KLF4 in Makrophagen?
2. Über welchen Mechanismus wird KLF4 in Makrophagen induziert?
3. Welche Funktion erfüllt KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit Pneumokokken?

4. Material und Methoden

4.1 Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Chemikalien entsprechen dem analytischen Reinheitsgrad und zellkulturspezifischen Anforderungen. Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Aqua bidest (doppelt destilliertes Wasser) angesetzt.

In Kapitel 4.1.1.3, Kapitel 4.1.3.3, Kapitel 4.1.4.5 und Kapitel 4.1.5 werden lediglich speziell verwendete Materialien bzw. Geräte gelistet. Gängiges und in dieser Arbeit eingesetztes Laborzubehör wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. entspricht den allgemeinen Standards und wird nicht gesondert aufgeführt.

4.1.1 Zellkultur

4.1.1.1 Verwendete Primärzellen

Als Modellzellen im Rahmen dieser Arbeit dienten murine, aus Knochenmarkszellen differenzierte Makrophagen (engl. „*bone marrow-derived macrophages*“, BMMs). Ihre Gewinnung erfolgte aus Wildtyp- (WT) bzw. TLR9 *knockout* (KO), MyD88 KO, TRIF KO, NOD2 KO, NLRP3 KO, ASC KO, STING KO, RAGE KO, IFNAR KO, KLF4 WT und KLF4 *knockdown* (KD) Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund. Vor Gewinnung der Knochenmarkszellen aus KLF4 WT (ERT-Cre^{-/-}/KLF4^{loxPloxP}) und KLF4 KD (ERT-Cre^{+/-}/KLF4^{loxPloxP}) Mäusen wurden diese einmal täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen mit 1 mg 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) i.v. behandelt. Die KLF4 WT und KLF4 KD Mäuse wurden von Gary K. Owens (Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, Charlottesville) zur Verfügung gestellt.

4.1.1.2 Medien Zellkultur

Tabelle 2: Medien Zellkultur

Medium	Zusammensetzung	Bezugsquelle
BMM Wachstumsmedium	500 ml RPMI 1640	Gibco (Life Technologies)
	20% Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
	30% L929 Fibroblasten-Überstand	siehe Kapitel 4.2.1.1
	4,5 mM L-Glutamin (GlutaMAX)	Gibco (Life Technologies)
	100 µg/ml Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
BMM Überführungsmedium	500 ml RPMI 1640	Gibco (Life Technologies)
	10% FCS	PAA
	15% L929 Fibroblasten-Überstand	siehe Kapitel 4.2.1.1
	4,5 mM L-Glutamin (GlutaMAX)	Gibco (Life Technologies)
BMM Kryomedium	90% FCS	PAA
	10% Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
L929 Fibroblastenmedium	500 ml RPMI 1640	Gibco (Life Technologies)
	10% FCS	PAA
	4,5 mM L-Glutamin (GlutaMAX)	Gibco (Life Technologies)

Vor Einsatz der Medien wurden diese mittels eines Vakuum-Filtrationsgerätes steril filtriert.

4.1.1.3 Substanzen und Verbrauchsmaterialien Zellkultur

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien Zellkultur

Verbrauchsmaterialien	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Dulbeccos PBS (1x)	Waschen und Ablösen der BMMs	PAA
EDTA	Ablösen der BMMs	Fluka (Sigma-Aldrich)
Ethanol 70%ig	Desinfektion der Mauseknochen	J.T. Baker
Lochplatten (<i>multi-well plates</i>)	Stimulation der BMMs	BD Biosciences
Optilux-Petrischale	Differenzierung der BMMs	BD Biosciences
RPMI 1640	Isolierung der Knochenmarkszellen	Gibco (Life Technologies)
T175 Zellkulturflaschen	Kultur von L929-Fibroblasten	BD Biosciences
Vakuum-Filtrationsgerät (<i>Rapid-Flow Filter Unit</i> , 0,2µm)	Filtrierung der Zellkulturmedien	Nalgene (Thermo Scientific)
Zellfilter (<i>Cell Strainer</i> , 70 µm)	Isolierung der Knochenmarkszellen	BD Biosciences
Zellschaber (<i>Cell Scraper</i> , 25 cm)	Ablösen der BMMs	Sarstedt

4.1.2 Stimulantien und Inhibitoren

Tabelle 4: Stimulantien und Inhibitoren

Stimulanz oder Inhibitor	Wirkungsweise	Bezugsquelle
4-Amino-5-(4-chlorphenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP2)	Inhibitor der Src-Kinasen	Biosource
4-Amino-7-phenylpyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP3)	Negativkontrolle für PP2	Calbiochem
Cytochalasin D (Cyto D)	Inhibitor der Phagozytose	Sigma-Aldrich
Interferon β (IFNβ)	Agonist von IFNAR	Invivogen
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Salmonella minnesota</i>	Agonist von TLR4	Enzo Life Sciences
Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid (Malp-2)	Agonist von TLR2	Alexis Biochemicals
Muramyldipeptid (MDP)	Agonist von NOD2	Alexis Biochemicals
ODN M362 (CpG)	Agonist von TLR9	Invivogen
Polyinosin-polycytidyl Säure (Poly(I:C))	Agonist von TLR3	Invivogen
Zymosan (Zym)	Agonist von TLR2 und CLR	Invivogen

4.1.3 Bakterienkultur

4.1.3.1 Pneumokokkenstämme D39, D39 Δ cps, R6x, R6x Δ ply, R6x Δ lytA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der bekapselte Serotyp 2 Pneumokokkenstamm D39, die kapsellosen Serotyp 2 Mutanten D39 Δ cps und R6x, die Kapsel- und Pneumolysin-defiziente R6x-Mutante R6x Δ ply und die Kapsel- und Autolysin A (LytA)-defiziente R6x-Mutante R6x Δ lytA verwendet. Die Stämme D39, D39 Δ cps, R6x und R6x Δ ply wurden von Sven Hammerschmidt (Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Universität Greifswald) und der Stamm R6x Δ lytA von Pedro García (Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain) zur Verfügung gestellt.

Die Arbeit mit *Streptococcus pneumoniae* erfolgte steril unter einer Sicherheitswerkbank der Sicherheitsstufe S2.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Pneumokokkenstämme

Stamm	Bezeichnung im Rahmen der Arbeit	Selektionsantibiotikum
D39	D39	-
D39 Δ cps	<i>S.p.</i> Δ cps	Kanamycin (50 mg/ml)
R6x	<i>S.p.</i> Δ cps	-
R6x Δ ply	<i>S.p.</i> Δ cps Δ ply	Erythromycin (1 mg/ml)
R6x Δ lytA	<i>S.p.</i> Δ cps Δ lytA	Kanamycin (50 mg/ml)

4.1.3.2 Medien Bakterienkultur

Tabelle 6: Medien Bakterienkultur

Medium	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<i>S.p.</i> Anzuchtbouillon	30 g Todd Hewitt Broth	BD Biosciences
	5 g Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
	1000 ml A. bidest.	
<i>S.p.</i> Kryomedium	80% <i>S.p.</i> Anzuchtbouillon	
	20% Glycerol 99 %ig	Sigma-Aldrich

Nach Herstellung der Medien erfolgte eine Autoklavierung für 15 Minuten bei 115 °C.

4.1.3.3 Substanzen und Verbrauchsmaterialien Bakterienkultur

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien Bakterienkultur

Verbrauchsmaterialien	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Columbia Agar Platten (5% Schafsblut)	Anzucht von <i>S.p.</i>	BD Biosciences
Dulbeccos PBS (1x)	Waschen Phagozytose-Assay	PAA
Erythromycin (1 mg/ml)	Selektion R6x <i>Aply</i>	Sigma-Aldrich
Ethanol 70%ig	Inaktivierung von Pneumokokken	J.T. Baker
Gentamycin (50 mg/ml)	Phagozytose-Assay	Sigma-Aldrich
Impfösen (10 µl)	Ausplattieren von Bakterien	Roth
Kanamycin (50 mg/ml)	Selektion R6x <i>AlytA</i> und D39 <i>Δcps</i>	Sigma-Aldrich
Küvetten	Messung der OD ₆₀₀	Sarstedt
Natriumperiodat (1 µg/ml)	Inaktivierung von Pneumokokken	Sigma-Aldrich
Pronase E (100 µg/ml)	Inaktivierung von Pneumokokken	Sigma-Aldrich
Proteinase K (1000 µg/ml)	Inaktivierung von Pneumokokken	Merck
Saponin 1%ig	Lyse Phagozytose-Assay	Fluka
Sterile Watteträger	Überführen von Bakterien	Applied SA
Transwell-System	Trennung Bakterien und BMMs	Corning Inc

4.1.4 Molekularbiologie

4.1.4.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Puffer und Lösungen für ELISA

Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Waschpuffer	1000 ml Dulbeccos PBS (1x)	PAA
	0,05% Tween20	Sigma-Aldrich
Probenverdünnungspuffer (<i>Reagent diluent</i>)	PBS (1x)	R&D Systems
	1% FCS	R&D Systems
Substratlösung	50% Wasserstoffperoxid	BD Bioscience
	50% 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	BD Bioscience
Stopplösung	27,47 ml H ₂ SO ₄ (95-97%ig)	Merck
	500 ml A. bidest.	

Tabelle 9: Puffer und Lösungen für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Phosphoproteinwaschpuffer	5 ml Natriumorthovanadat 98%ig (200 mM)	Sigma-Aldrich
	50 ml Natriumpyrophosphat (150 mM)	Sigma-Aldrich
	50 ml Natriumfluorid 99%ig (1 M)	Sigma-Aldrich
	500 ml Dulbeccos PBS (1x)	PAA
Lysepuffer zur Proteinextraktion	50 mM Tris-HCl (pH 7,4)	Sigma-Aldrich
	10 µg/ml Complete Tabletten	Roche
	1% Nonidet® P-40 (99 %ig)	Fluka (Sigma-Aldrich)
	1 ml Phosphoproteinwaschpuffer	
Bradford Reagenz	20% BioRad Protein Assay	BioRad
	80% A. bidest.	
Gelladepuffer (Blaupuffer)	1 ml Tris-HCl, 0,5 M (pH 6,8)	Sigma-Aldrich
	0,8 ml Glycerol	Sigma-Aldrich
	1,6 ml SDS (10% w/v)	Serva
	0,4 ml Bromphenolblau (1% w/v)	Pharmacia Biotech
	0,4 ml β-Mercaptoethanol (1% w/v)	Sigma-Aldrich
	5 ml A. bidest.	
Gelelektrophoresepuffer	3 g Tris-Base	Sigma-Aldrich
	14,4 g Glycin	Merck
	1 g SDS (10% w/v)	Serva
	1000 ml A. bidest.	
Blotpuffer	3 g Tris-Base	Sigma-Aldrich
	14,4 g Glycin	Merck
	20% Methanol	Merck
	1000 ml A. bidest.	
Blockpuffer	50% Ody Blocking Buffer	LI-COR
	50% Dulbeccos PBS (1x)	PAA
Waschpuffer	500 ml Dulbeccos PBS (1x)	PAA
	0,1% Tween20	Sigma-Aldrich

Tabelle 10: Puffer für Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris-Base	Sigma-Aldrich
	20 mM Natriumacetat	Roth
	1 mM EDTA	Fluka (Sigma-Aldrich)
	500 ml A. bidest.	
6x Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau	Pharmacia Biotech
	40% w/v Saccharose	Merck
	200 ml A. bidest.	

4.1.4.2 Gele

Tabelle 11: Gele für Western Blot

Gel	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Sammelgel (für 4 Gele)	2,5 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	Sigma-Aldrich
	100 µl SDS (10% w/v)	Serva
	1,33 ml 40%iges Bis-Acrylamid (Ratio 19:1)	Serva
	10 µl TEMED	R&D Systems
	50 µl Ammoniumpersulfat (10% w/v)	Serva
	6 ml A. bidest.	
Trenngel 10%ig (für 4 Gele)	5 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8)	Sigma-Aldrich
	200 µl SDS (10% w/v)	Serva
	5 ml 40%iges Bis-Acrylamid (Ratio 19:1)	Serva
	10 µl TEMED	R&D Systems
	100 µl Ammoniumpersulfat (10% w/v)	Serva
	9,7 ml A. bidest.	

4.1.4.3 Antikörper

Tabelle 12: Western Blot-Antikörper (AK)

Zielstruktur	Spezifizierung	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
KLF4	Primär-AK	Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotech
β-Aktin	Primär-AK	Ziege	1:1000	Santa Cruz Biotech
Anti-Kaninchen-IgG	Sekundär-AK	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	1:2000	Rockland
Anti-Ziege-IgG	Sekundär-AK	Maus, gekoppelt an IRDye800	1:2000	Rockland

Primärantikörper wurden in Blockpuffer mit 0,01% Tween20 und Sekundärantikörper in Blockpuffer mit 0,1% Tween20 angesetzt.

4.1.4.4 Kits

Tabelle 13: Kits

Kit	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Mouse CXCL1/KC DuoSet	KC ELISA	R&D Systems
Mouse IL-10 DuoSet	IL-10 ELISA	R&D Systems

4.1.4.5 Substanzen und Verbrauchsmaterialien Molekularbiologie

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien Molekularbiologie

Verbrauchsmaterialien	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Agarose	Agarose-Gelelektrophorese	Merck
Chloroform	RNA-Isolierung	Merck
DNA Ladder 1 kb	Größenstandart Gelelektrophorese	New England Biolabs
DNase (0,5 U/ μ l)	DNA-Verdau	5 Prime
Dulbeccos PBS (1x)	Western Blot und ELISA	PAA
ELISA-Platte (Maxisorp)	Durchführung ELISA	Thermo Scientific
Ethanol 75%ig	RNA-Isolierung	J.T. Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Agarose-Gelelektrophorese	Sigma-Aldrich
GlycoBlue	RNA-Isolierung	Life Technologies
Isopropanol	RNA und DNA-Isolierung	Sigma-Aldrich
Lysozym	DNA-Isolierung	Merck
Mutanolysin	DNA-Isolierung	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	DNA-Isolierung	Roth
Nitrocellulose Hybond Membran	Proteintransfer Western Blot	Santa Cruz Biotech
N-Laurolyl-Sarcosyl	DNA-Isolierung	Sigma-Aldrich
N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-Aminoethansulfonsäure (TES)	DNA-Isolierung	Sigma-Aldrich
Phenol	DNA-Isolierung	Merck
<i>Precision plus protein kaleidoscope standard</i>	Proteinmarker Western Blot	BioRad
Pronase E (100 μ g/ml)	DNA-Isolierung	Sigma-Aldrich
RNase (7000 U/ml)	DNA-Isolierung	5 Prime
Rotilabo-Abdeckfolie	Versiegelung ELISA-Platten	Roth
Streptavidin-HRP	ELISA	eBioscience
Tris-EDTA-Puffer	DNA-Isolierung	Sigma-Aldrich
Trizol	RNA-Isolierung	Quiagen
Tween20	Lösung Western Blot-Antikörper	Sigma-Aldrich
Whatman Filterpapier	Proteintransfer Western Blot	Whatman

4.1.5 Geräte

Tabelle 15: Geräte

Gerät	Verwendungszweck	Bezugsquelle
BioPhotometer	Proteinbestimmung und OD ₆₀₀ Messung	Eppendorf
BlotSystem	Proteintransfer Western Blot	Transblot
CAMEDIA C-4040 200M	Digitalkamera Gelelektrophorese und Mikroskop	Olympus
Gelelektrophorese System	Agarose-Gelelektrophorese und Western Blot	BioRad
Heizblock Thermostat comfort	Erhitzen der Proteine auf 95 °C	Eppendorf
Mikroskop IMT-2	Beurteilung der Zellen	Olympus
NanoDrop 2000	Bestimmung DNA- und RNA-Konzentration	Thermo Scientific
Odyssey Scanner	Dokumentation Western Blot	LI-COR
Plattenleser MR5000	Dokumentation ELISA	Dynatech
Polymax 1040	Schwenken der Blotmembranen Western Blot	Heidolph Instr.
RCT basic	Magnetrührer Western Blot	Ika-Labortechnik
UV-Transilluminator UST-20M-8K	Agarose-Gelelektrophorese	Biostep
Vortex Genie 2	Mischen von Proben	Schütt Labortechn.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden an einer Reinraumwerkbank der Sicherheitsstufe 2 mit autoklaviertem oder heißluftsterilisiertem Laborzubehör und steril filtrierten Lösungen durchgeführt. Nach Kontakt mit humanem oder murinem Zellmaterial wurde die Arbeitsfläche mit Descosept desinfiziert (Dr. Schumacher GmbH). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Zellkulturmedien wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C angewärmt.

4.2.1.1 Kultur von murinen Fibroblasten

Die Kultur von murinen L929-Fibroblasten erfolgte zur Produktion von Monozytenkolonien-stimulierendem Faktor (engl. „*macrophage colony-stimulating factor*“, M-CSF), welcher als Bestandteil des BMM-Wachstumsmediums für die Differenzierung von murinen Knochenmarkszellen (engl. „*bone marrow-derived cells*“, BMCs) in murine Makrophagen (BMMs) benötigt wird. Die L929-Fibroblasten wurden in Fibroblastenmedium in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens für zehn Tage im Brutschrank inkubiert. Der M-CSF-haltige Überstand wurde nach Ablauf dieses Zeitraumes steril filtriert, aliquotiert und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

4.2.1.2 Isolation von murinen Knochenmarkszellen

Die Extremitätenknochen euthanasierter Wiltyp und *knockout* Mäuse wurden abgetrennt, von Restgewebe befreit, mit 70% Ethanol desinfiziert und in RPMI gewaschen. Anschließend wurden die Knochen in 20 ml frisches RPMI überführt, mittels Porzellanmörser zerkleinert und zur Entfernung von Knochenfragmenten gefiltert (Cell Strainer, 70 µm Porengröße). Nach Zentrifugation für 10 min bei 150 g wurde das entstandene Zellpellet in BMM-Kryomedium resuspendiert, in einer Konzentration von 10⁷ Zellen/ml aliquotiert, in Gefrier Röhrchen schrittweise auf -80 °C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.1.3 Differenzierung der murinen Knochenmarkszellen in Makrophagen

Für die Differenzierung von BMMs aus BMCs wurde ein Aliquot isolierter BMCs aufgetaut, in 10 ml BMM-Wachstumsmedium überführt und für 10 min bei 230 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 20 ml frischem BMM-Wachstumsmedium und eine Aufteilung der Zellsuspension auf zwei Optilux-Petrischalen (BD Biosciences) zur Kultivierung für 8-10 Tage im Brutschrank. Alle 4 Tage wurde jeweils 10 ml frisches BMM-Wachstumsmedium hinzugefügt und nach Ablauf der Differenzierungszeit die erfolgreiche Bildung eines konfluenten Zellrasens der nun am Boden der Optilux-Petrischalen adhärenen BMMs lichtmikroskopisch überprüft.

Für die Überführung der BMMs in Lochplatten (engl. „*multi-well plates*“) zur Durchführung von Experimenten erfolgte nach Absaugen des BMM-Wachstumsmediums eine Ablösung der Zellen vom Boden der Optilux-Petrischalen mit kaltem PBS plus 2 mM EDTA und vorsichtigem Scrapen. Nach Waschen der Zellen in BMM-Überführungsmedium, Zellzählung und erneuter Resuspension in BMM-Überführungsmedium wurden die BMMs in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in die Wells der Lochplatten ausgesät. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank adhärten die BMMs am Boden der Lochplatten und konnten anschließend für Experimente verwendet werden.

4.2.1.4 Behandlung der Makrophagen mit Stimulatoren und Inhibitoren

Die BMMs wurden entsprechend der experimentellen Fragestellung mit 1 µg/ml ODNM362 (CpG), 0,1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), 10 µg/ml Polyinosin-polycytidyl Säure (Poly(I:C)), 10 µg/ml Muramyldipeptid (MDP), 0,1 µg/ml Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid (Malp-2), 25/100/500 µg/ml Zymosan (Zym) bzw. 500 U/ml Interferon β (IFNβ) gelöst in BMM-Überführungsmedium für 6 Stunden stimuliert.

Zur Blockade des Src-Signalweges erfolgte vor der Stimulation mit Pneumokokken eine Inkubation der BMMs für eine Stunde mit 10 µM des Src-Kinasen Inhibitors 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP2) bzw. mit 10 µM des inaktiven PP2-Analogen 4-Amino-7-phenylpyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP3) als Negativkontrolle gelöst in BMM-Überführungsmedium.

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

Sämtliche mikrobiologischen Arbeitsschritte erfolgten an einer Reinraumwerkbank der Sicherheitsstufe 2 mit autoklaviertem oder heißluftsterilisiertem Laborzubehör und steril filtrierten Lösungen. Nach Kontakt von Geräten oder Materialien mit Bakterien wurden diese mit Descosept (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert und autoklaviert. Bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden mit 10%iger Incidinlösung behandelt und im Anschluss ebenfalls autoklaviert. Die Inkubation der Pneumokokken erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

4.2.2.1 Kultur von *Streptococcus pneumoniae*

Die Lagerung sämtlicher, im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Pneumokokkenstämme erfolgte in Kryostocks. Zur Gewinnung dieser Stocks wurden die Pneumokokken mittels Impfösen auf Blutagarplatten, ggf. in Kombination mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum (siehe Kapitel 4.1.3.1), ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden einige der gewachsenen Kolonien auf eine neue Blutagarplatte übertragen und erneut für 10 Stunden im Brutschrank inkubiert. Schließlich erfolgte eine Überführung aller gebildeten Kolonien mit Hilfe eines sterilen Watteträgers in Gefrierföhrchen mit *S.p.*-Kryomedium (siehe Kapitel 4.1.3.2) und eine Lagerung bei -80 °C. Für Infektionsversuche wurde der benötigte Pneumokokkenstamm aus dem Kryostock am Abend vor dem Versuch mittels Impföse auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte eine Überführung der gewachsenen Kolonien in *S.p.*-Anzuchtbouillon (siehe Kapitel 4.1.3.2) bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge) von 0,03 – 0,06. Dies entspricht einer Konzentration von 3 – 6x10⁷ Kolonien (engl. „colony forming units“, cfu) pro ml. Anschließend wurde die Flüssigkultur für 2,5 – 3,5 Stunden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,4 (der Phase des mittleren logarithmischen Bakterienwachstums) im Brutschrank bebrütet. Nach Erreichen der Ziel-OD₆₀₀ (welche einer Bakterienkonzentration von 2 – 4x10⁸ cfu/ml entspricht) erfolgte eine Zentrifugation der Pneumokokkensuspension für 10 min bei 1800 g. Das entstandene Pellet wurde mit RPMI gewaschen, erneut zentrifugiert, in BMM-Überführungsmedium (siehe Kapitel 4.1.1.2) resuspendiert und auf die für die Stimulation benötigte Pneumokokkenkonzentration (cfu/ml) verdünnt.

4.2.2.2 Stimulation der Makrophagen mit *Streptococcus pneumoniae*

Zur Stimulation der BMMs mit *Streptococcus pneumoniae* wurde das BMM-Überführungsmedium aus den Wells der Lochplatten mit den am Boden der Wells adhärenen BMMs abgesaugt und die benötigte Anzahl (cfu/ml) an Pneumokokken in BMM-Überführungsmedium in die Wells pipettiert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Stimulation in einem Infektionsverhältnis von 2,5 (engl. „multiplicity of infection“, MOI) für 6 Stunden (Western Blot-Analysen) oder 6 und 15 Stunden (ELISA-Versuche).

4.2.2.3 Inaktivierung von Pneumokokken

Zur Inaktivierung der Pneumokokken wurden 1×10^9 cfu/ml gelöst in PBS für 1 Stunde mit 70% Ethanol (auf Eis) oder 56 °C Hitze (im Wasserbad) bzw. für 30 Minuten mit Natriumperodat (1 µg/ml), Proteinase K (1000 µg/ml) oder Pronase E (100 µg/ml) behandelt. Für die Stimulationsexperimente wurden die inaktivierten Pneumokokken anschließend in BMM-Überführungsmedium auf die für die Versuche benötigten Konzentrationen verdünnt.

4.2.2.4 Inhibierung der Phagozytose und Phagozytose-Assay

Zur Inhibierung der Phagozytose wurden die BMMs in Lochplatten ausgesät (siehe Kapitel 4.2.1.3) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand aus den Wells abgesaugt, und die BMMs für 30 min mit 2 µM Cytochalasin D (Cyto D) in BMM-Überführungsmedium behandelt (Inkubation im Brutschrank). Cyto D ist ein Toxin, welches durch Blockade der Mikrofilament-Polymerisation die Phagozytose inhibiert [109].

Zum Nachweis der erfolgreichen Blockade der Phagozytose erfolgte anschließend ein Phagozytose-Assay. Dafür wurden die BMMs nach Cyto D-Behandlung bzw. ohne vorherige Behandlung mit Cyto D für eine Stunde mit 1×10^7 cfu/ml Pneumokokken infiziert. Unmittelbar nach Zugabe der Pneumokokken wurden die Lochplatten für 30 Sekunden bei 1800 g zentrifugiert, um die Kontakthäufigkeit zwischen den am Boden adhärenen BMMs und den Pneumokokken im Überstand zu erhöhen. Nach einer Stunde Infektion im Brutschrank wurde den Infektionsansätzen 50 µg/ml Gentamycin beigemischt, um die noch nicht phagozytierten Pneumokokken im Überstand bzw. auf der Außenseite der BMMs abzutöten. Nach einer weiteren Stunde Inkubation im Brutschrank wurden 50 µl der Überstände zum Nachweis der Bakterienfreiheit auf Blutagarplatten ausgestrichen. Die

Restüberstände wurden anschließend abgesaugt, die BMMs dreimal mit PBS gewaschen und schließlich für 10 Minuten mit 1%igem Saponin in PBS lysiert. Die Lysate wurden ebenfalls auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die gewachsenen Kolonien in den Überständen bzw. Lysaten ausgezählt.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Präparation von DNA und DNase-Verdau

Die Präparation der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bakteriellen, murinen und humanen DNA erfolgte aus pro- bzw. eukaryotischen Zellen und soll exemplarisch anhand der DNA-Extraktion aus *Streptococcus pneumoniae* erläutert werden. Nach Generierung eines Pneumokokkenpellets durch Kultivierung der Pneumokokken in 50 ml *S.p.*-Anzuchtbouillon für 8 Stunden und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 1800 g, wurde das Pellet in 6 ml N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES) resuspendiert, mit 1 ml Lysozym und 100 µl Mutanolysin versetzt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 100 µl RNase (Konzentration 7000 U/ml) und 50 µl Pronase E (Konzentration 100 µg/ml) mit jeweils 15 minütiger Inkubation im Brutschrank sowie von 500 µl N-Laurolyl-Sarcosyl mit anschließend einstündiger Inkubation. Die Suspension wurde nachfolgend mit 2 ml Phenol durchmischt und 10 min bei 350 g zentrifugiert. Die dabei entstandene obere, milchige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1:1 Isopropanol und 1:10 Natriumacetat vermennt. Die in Form weißlicher Fäden ausfallende DNA konnte vorsichtig mit einer Pipettenspitze herausgefischt und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert werden. Nach zweimaligem Waschen mit 75%igem Ehtanol erfolgte eine Lösung der DNA in 200 µl Tris-EDTA-Puffer und die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Nanodrop.

Der Verdau der DNA erfolgte durch vorsichtige Mischung von 5 µg DNA mit 5 Units (U) DNase und Inkubation über Nacht im Brutschrank.

4.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Der DNase-Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Die negativ geladene DNA wandert durch ein Spannungsfeld in Richtung Anode, wobei sich kleine Fragmente schneller als große durch die Poren des Agarose-Gels bewegen können.

Für die Herstellung des 1%igen Agarose-Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gelöst und für 2 min bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt. Unterdessen erfolgte ein Zusammenbau des Gelgießstandes mit Einsetzen eines Kamms für die späteren Geltaschen. In die erhitzte Agarose wurden 4 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml) zur anschließenden Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht eingemischt und die Lösung luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Nach Abkühlung und Polymerisierung des Gels wurde dieses in die Laufkammer überführt und mit 1x TAE-Puffer vollständig bedeckt. 5 µl Größenstandard bzw. 15 µl der DNA-Proben (verdaut mit DNase und unverdaut), versetzt mit 0,2 Vol% 6x Ladepuffer, wurden anschließend auf das Gel aufgetragen und für etwa 45 min bei 100 V aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mittels UV-Transilluminator und Fotokamera.

4.2.3.3 Präparation bakterieller RNA

Nach Gewinnung eines Pneumokokkenpellets durch Kultivierung der Pneumokokken in 50 ml *S.p.*-Anzuchtbouillon für 8 Stunden und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 1800 g, erfolgte eine Resuspension des Pellets in 1 ml Trizol mit anschließender Lagerung über Nacht bei -80 °C. Am nächsten Morgen wurde die Probe aufgetaut, mit 200 µl Chloroform versetzt, für 15 Sekunden geschüttelt und nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Von den sich gebildeten 3 Phasen wurde vorsichtig die oberste klare Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl kaltem Isopropanol sowie 2 µl GlycoBlue zur Anfärbung des RNA-Pellets gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation bei -20 °C und erneuter Zentrifugation (15 min, 16000 g, 4 °C) wurde das nun blau gefärbte Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend bei Raumtemperatur für etwa 2 Stunden getrocknet. Das trockene Pellet konnte schließlich in 50 µl RNase-freiem destilliertem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration im Spektralphotometer (Nanodrop) gemessen werden.

4.2.3.4 Western Blot

Nach Durchführung der Stimulationsexperimente wurde zur Proteingewinnung aus den Makrophagen der Überstand aus den Lochplatten abgesaugt, die Zellen zweimal mit kaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen, auf Eis Lysepuffer zugegeben, die noch am Boden adherenten Zellen mittels Zellscraper abgelöst und das Lysat anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 25000 g erfolgte ein Transfer des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und die Proteinbestimmung nach Bradford bei 595 nm im Photometer in Bradford Reagenz. Anschließend wurden 40 µg Protein 1:1 mit Gelladepuffer (Blaupuffer) versetzt und 5 min bei 95 °C im Wärmeblock unter Schütteln gekocht.

In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung des Sammel- und 10%igen Trenngels (siehe Kapitel 4.1.4.2). Nach Auspolymerisierung der Gele wurden die Geltaschen mit den Proteinproben sowie einem Größenstandard (*precision plus protein kaleidoscope standard* von BioRad) geladen. Nach Überführung des beladenen Gels in die Laufkammer erfolgte eine Auftrennung der Proben nach Molekulargewicht in Gelelektrophoresepuffer bei 130 V, bis der Gelladepuffer (Blaupuffer) aus dem Gel ausgelaufen war.

Für den Proteintransfer der Proben aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (engl. „*hybond blotting membrane*“) wurde das Gel in ein „Blotsandwich“ eingebaut. Dieses Sandwich setzte sich der Reihe nach aus einem Schwämmchen, zwei Lagen Whatman-Filterpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Gel, zwei weiteren Lagen Whatman-Filterpapier und noch einem Schwämmchen in einer Plastikkassette zusammen. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde in eiskaltem Blotpuffer mit Eisblock bei 100 V in einer Blotkammer unter ständiger Zirkulation des Puffers durch einen Magnetrührer.

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer geblockt und anschließend über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Kapitel 4.1.4.3) bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 10 min mit Waschpuffer und eine Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen (zweimal mit Waschpuffer, einmal mit PBS für jeweils 10 min) und schließlich bei 700 und 800 nm im Odyssey Scanner (Li-COR) gescannt. Die Auswertung der Scans und Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software Odyssey Version 2.0.

4.2.3.5 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Zur Bestimmung der Zytokine KC und IL-10 wurde der Überstand der Stimulationsexperimente mittels Sandwich-ELISA (Kits siehe Kapitel 4.1.4.4) gemäß den Herstellerangaben analysiert. Zunächst erfolgte eine Beschichtung der ELISA-Platten mit 100 µl pro Well des entsprechenden in PBS gelösten Primärantikörpers (Konzentration 2 µg/ml) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurden die Wells 3x mit Waschpuffer (siehe Kapitel 4.1.4.1) gewaschen und für eine Stunde mit 300 µl Probenverdünnungspuffer geblockt. Nach erneutem Waschen wurden die Standards und Proben pur (IL-10) bzw. 1:100 (KC) in Probenverdünnungspuffer aufgetragen (100 µl pro Well), die Platten anschließend mit einer Klebefolie versiegelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und nochmaligem Waschen wurden 100 µl Sekundärantikörper (200 ng/ml in Probenverdünnungspuffer) pro Well zugegeben und die Platten nach Versiegelung erneut für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschschrift erfolgte eine Zugabe von 100 µl pro Well Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (engl. „*streptavidin-horseradish peroxidase*“, Streptavidin-HRP) gelöst in Probenverdünnungspuffer für 20 min, ein letzter Waschschrift sowie die Zugabe der Substratlösung mit einer Inkubation von etwa 20 Minuten im Dunkeln. Die Farbreaktion wurde anschließend mit 50 µl Stopplösung pro Well gestoppt und die Intensität des Farbumschlages bei 450 nm im Plattenlesegerät (engl. „*platereader*“) gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels PRISM 5.0 (Graph Pad Prism®).

4.2.3.6 Statistik

Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Mikroskopiebildern und Western Blots handelt es sich um repräsentative Darstellungen aus mindestens zwei, in der Regel drei unabhängigen Experimenten.

Die ELISA Daten resultieren aus Mittelwerten der Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse wurden mittels *One way ANOVA* und *Newman Keuls Post Test* statistisch ausgewertet. Für Abbildung 4B und D bzw. Abbildung 6B und D wurde ein *unpaired T-Test* angewendet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) wurden als statistisch signifikant betrachtet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde mit einem, kleiner 0,01 mit zwei und kleiner 0,001 mit drei Sternen markiert.

5. Ergebnisse

5.1 Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in Makrophagen

Zahlten et al. konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor KLF4 in humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) durch freie bakterielle DNA von *Streptococcus pneumoniae* über TLR9, MyD88 und Src-Kinasen induziert wird [97]. Im folgenden Abschnitt soll der Induktionsmechanismus von KLF4 durch Pneumokokken in Makrophagen beschrieben werden. Als Modellzellen für diese Studie dienten murine, aus Knochenmarkszellen differenzierte Makrophagen (engl. „bone marrow-derived macrophages“, BMMs).

5.1.1 *Streptococcus pneumoniae* induziert dosisabhängig KLF4 in BMMs

Zunächst wurde untersucht, ob Pneumokokken KLF4 in Makrophagen überhaupt induzieren. Dafür wurden Wildtyp BMMs (WT BMMs) für 6 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der unbekapselten Serotyp 2 Mutante D39 Δ cps stimuliert und die KLF4 Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Eine kapsellose Mutante wurde verwendet um die kapselbedingte Maskierung von bakteriellen Oberflächenstrukturen zu vermeiden, die eventuell an der Induktion von KLF4 beteiligt sein könnten. Der Einfluss der Kapsel auf die Induktion von KLF4 wird später untersucht. Der Stimulationszeitraum von 6 Stunden basiert auf Voruntersuchungen der gastgebenden Arbeitsgruppe.

Unstimulierte BMMs exprimierten kein KLF4, wohingegen nach einer Stimulation mit D39 Δ cps (*S.p.* Δ cps) ab einer Konzentration von 1×10^4 cfu/ml KLF4 dosisabhängig induziert wurde (siehe Abbildung 3A). Das konstitutiv exprimierte Protein Aktin diente als Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern.

Anschließend wurde die Expression von KLF4 nach Stimulation mit den beiden unbekapselten D39 Serotyp 2 Mutanten D39 Δ cps und R6x verglichen, wobei sich kein Unterschied zeigte (siehe Abbildung 3B). Beide Mutanten werden in den folgenden Abschnitten daher als *S.p.* Δ cps bezeichnet.

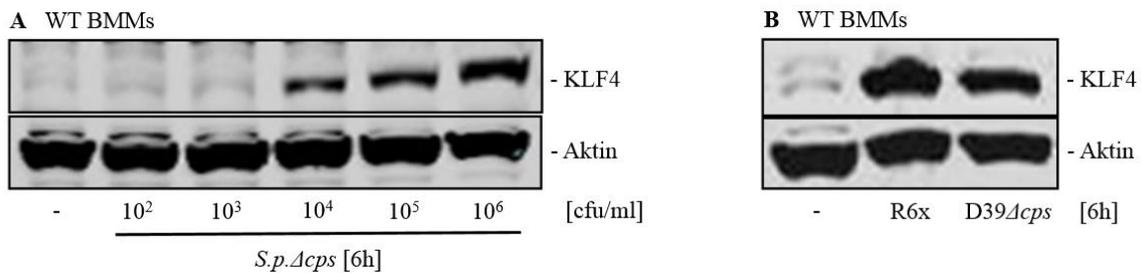


Abbildung 3: *Streptococcus pneumoniae* induziert KLF4 in WT BMMs

Nachweis der Induktion von KLF4 in WT BMMs mittels Western Blot nach Stimulation mit *S.p. Δcps* in verschiedenen Konzentrationen für 6 Stunden (A). Die unbekapselten Serotyp 2 Mutanten D39Δcps und R6x (jeweils 1×10^6 cfu/ml) induzierten KLF4 in WT BMMs vergleichbar stark (B). Für die Western Blots wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung. (A) zeigt einen repräsentativen Blot aus 3 und (B) aus 2 unabhängigen Experimenten.

5.1.2 Die *Streptococcus pneumoniae*-induzierte KLF4 Expression in BMMs ist nur teilweise TLR9- und MyD88-abhängig und unabhängig von den Src-Kinasen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Induktion von KLF4 in Makrophagen durch *Streptococcus pneumoniae* wie in Bronchialepithelzellen über TLR9, MyD88 und die Src-Kinasen erfolgt. Nach Stimulation von WT und TLR9 *knockout* (KO) BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p. Δcps* und 1 µg/ml CpG-DNA (einem Agonisten von TLR9) zeigte sich, dass die Induktion von KLF4 durch *S.p. Δcps* in TLR9 KO BMMs im Vergleich zu WT BMMs um etwa 25% reduziert war (siehe Abbildung 4A und B), jedoch nicht vollständig blockiert. CpG war nicht in der Lage KLF4 zu induzieren.

Anschließend wurde die Beteiligung von MyD88 an der Induktion von KLF4 in BMMs untersucht. MyD88 ist ein essenzielles Adaptermolekül der Toll-like Rezeptoren und abgesehen von TLR3 in die Signalwege aller TLRs verschaltet [56]. Dabei zeigte sich, dass die Induktion von KLF4 durch *S.p. Δcps* in MyD88 KO BMMs im Vergleich zu WT BMMs wie bei TLR9 um etwa 25% reduziert war (siehe Abbildung 4C und D), jedoch wiederum nicht vollständig blockiert. 100 ng/ml LPS (ein Agonist von TLR4, für den sowohl ein MyD88- als auch TRIF-abhängiger Signalweg bekannt ist [40]) induzierten keine im Western Blot nachweisbare Expression von KLF4.

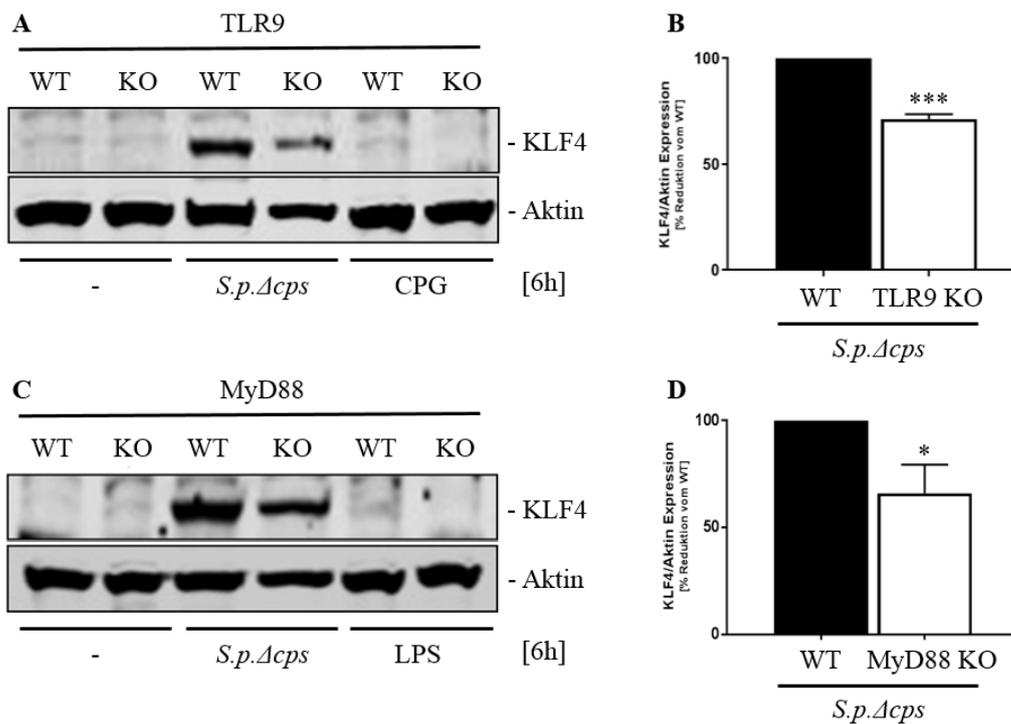


Abbildung 4: Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in BMMs ist teilweise abhängig von TLR9 und MyD88

Stimulation von WT BMMs und TLR9 KO (A) bzw. MyD88 KO BMMs (C) mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* und 1 μ g/ml CpG (A) bzw. 100 ng/ml LPS (C) für 6 Stunden. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 μ g Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A) und (C) zeigen einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten. Die KLF4 und Aktinbanden der mit *S.p.Δcps* stimulierten BMMs in (A) und (C) wurden mittels Odyssey 2.0 Infrared Imaging System quantifiziert und das Verhältnis von KLF4 zu Aktin berechnet. Das Ergebnis wurde als Reduktion vom WT dargestellt. (B) und (D) zeigen die Quantifizierungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten von (A) bzw. (C). Dabei zeigte sich sowohl in TLR9 KO (B) als auch MyD88 KO (D) BMMs eine um ca. 25% reduzierte Induktion von KLF4 im Vergleich zu den korrespondierenden WT BMMs. Statistik: unpaired T-Test. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Die Src-Kinasen steuern Signalwege in Makrophagen, die über eine Reorganisation des Zytoskeletts wichtige Funktionen wie Zelladhäsion, Mobilität und Phagozytose kontrollieren [110]. Sanjuan et al. konnten zeigen, dass Src-Kinasen in den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR9 in Makrophagen verschaltet sind [111]. Zur Untersuchung einer eventuellen Beteiligung der Src-Kinasen an der Regulation der KLF4 Expression in BMMs wurden WT BMMs für eine Stunde mit dem Src-Signalweginhibitor 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP2) sowie der PP2 Negativkontrolle 4-Amino-7-phenylpyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP3) (jeweils 10 μ M) vorbehandelt und anschließend für 6 Stunden mit *S.p.Δcps* stimuliert. Im Western Blot zeigte sich, dass *S.p.Δcps* trotz Blockade des Src-Signalweges KLF4 in WT BMMs unverändert induzierte (siehe Abbildung 5).

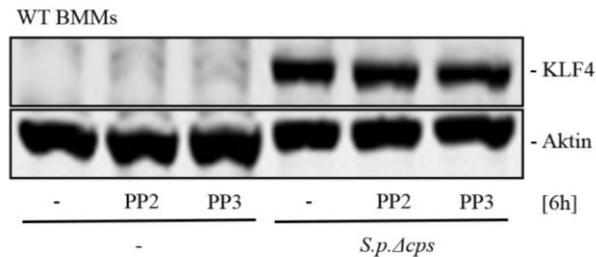


Abbildung 5: Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in BMMs ist unabhängig von den Src-Kinasen

WT BMMs wurden für eine Stunde mit 10 μ M PP2 (Src-Kinaseninhibitor) bzw. PP3 (inaktives PP2-Analogon) behandelt und anschließend für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p. Δcps* stimuliert. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt (40 μ g Gesamtproteinextrakt). Trotz Blockade des Src-Signalweges konnte *S.p. Δcps* KLF4 unverändert induzieren. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.1.3 Die Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken ist teilweise abhängig von TRIF, aber unabhängig von NOD2, TLR2, SIGN-R1, Ply und den Inflammasomen

Neben MyD88 ist TRIF das zweite wichtige TLR-Adaptermolekül [56]. Nach Stimulation von WT und TRIF KO BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p. Δcps* und 10 μ g/ml Poly(I:C) (Polyinosin-polycytidyl Säure, einem synthetischen RNA-Analogon und Agonisten des TRIF-abhängigen TLR3 [40]) zeigte sich, dass die Induktion von KLF4 durch *S.p. Δcps* in TRIF KO BMMs im Vergleich zu WT BMMs ebenfalls um ca. 25% reduziert war (siehe Abbildung 6A und B). Poly(I:C) war nicht in der Lage KLF4 zu induzieren.

Der zytosolische NLR NOD2 wird durch Peptidoglykanfragmente der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* aktiviert [77]. Im nächsten Schritt wurden daher WT und NOD2 KO BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p. Δcps* und 10 μ g/ml des NOD2-Agonisten Muramyldipeptid (MDP) stimuliert und die KLF4 Induktion im Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass NOD2 nicht an der Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken beteiligt ist (siehe Abbildung 6C und D).

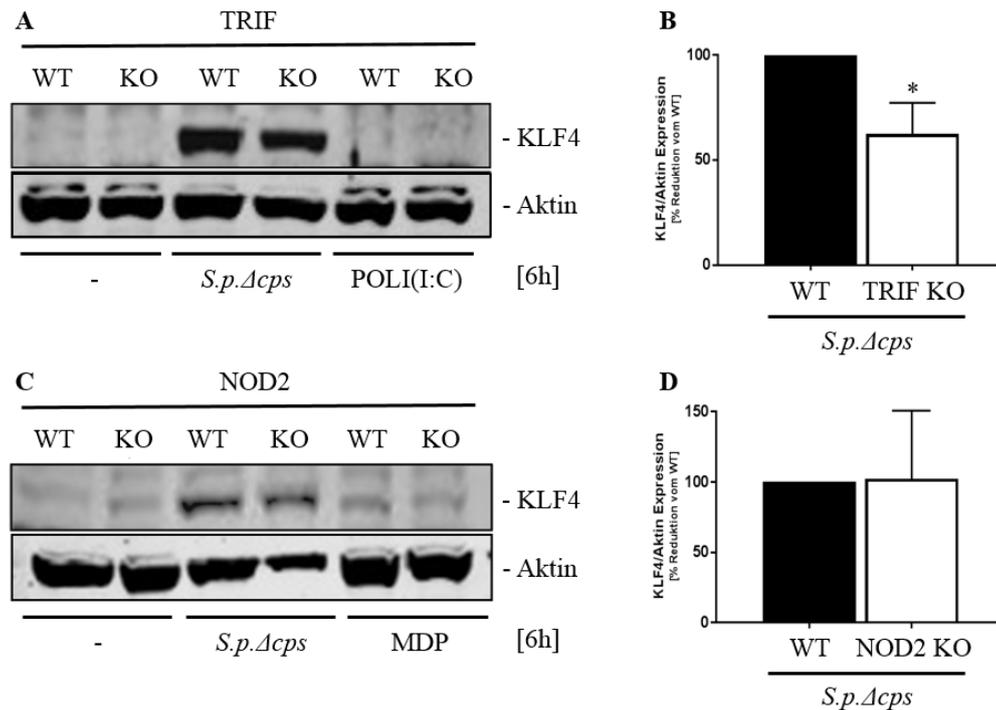


Abbildung 6: Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in BMMs ist teilweise abhängig von TRIF aber unabhängig von NOD2

Stimulation von WT BMMs und TRIF KO (A) bzw. NOD2 KO BMMs (C) mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* und 10 μ g/ml Poly(I:C) (A) bzw. 10 μ g/ml MDP (C) für 6 Stunden. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 μ g Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A) und (C) zeigen einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten. Die KLF4 und Aktinbanden der mit *S.p.Δcps* stimulierten BMMs in (A) und (C) wurden mittels Odyssey 2.0 Infrared Imaging System quantifiziert und das Verhältnis von KLF4 zu Aktin berechnet. Das Ergebnis wurde als Reduktion vom WT dargestellt. (B) und (D) zeigen die Quantifizierungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten von (A) bzw. (C). Dabei zeigte sich in TRIF KO BMMs eine um ca. 25% reduzierte Induktion von KLF4 (B). NOD2 KO BMMs exprimierten KLF4 nach Pneumokokkenstimulation vergleichbar stark wie die korrespondierenden WT BMMs (D). Statistik: unpaired T-Test. * $p < 0,05$.

TLR2 erkennt Zellwandbestandteile der Pneumokokken wie Peptidoglykan und Teichonsäureketten [73]. Das Makrophagen-aktivierende Lipopeptid (engl. „*macrophage-activating lipopeptide*“, Malp-2) aktiviert gezielt TLR2, welcher dafür mit TLR6 interagiert [50]. Eine Stimulation von WT BMMs mit 0,1 μ g/ml Malp-2 für 6 Stunden führte jedoch nicht zu einer Induktion von KLF4 (siehe Abbildung 7A). Auch eine gleichzeitige Stimulation von WT BMMs mit den TLR-Agonisten LPS (0,1 μ g/ml), Malp-2 (0,1 μ g/ml), CpG (1 μ g/ml) und dem NOD2-Agonisten MDP (10 μ g/ml) induzierte keine Expression von KLF4 im Western Blot (siehe Abbildung 7B).

Zymosan ist ein aus Hefepilzen isolierter Zellwandbestandteil und aktiviert TLR2 sowie CLRs auf der Oberfläche von Makrophagen wie Dectin-1 und SIGN-R1 [41, 112]. SIGN-R1 erkennt Kapselpolysaccharide von *Streptococcus pneumoniae* und fördert nach Aktivierung

die Phagozytose der Erreger [73]. Eine Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit Zymosan (ZYM) in verschiedenen Konzentrationen (25 – 500 µg/ml) führte nicht zu einer Induktion von KLF4 (siehe Abbildung 7C).

Pneumolysin (Ply), ein Virulenzfaktor von *Streptococcus pneumoniae*, aktiviert wahrscheinlich TLR4 [77]. Eine Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml eines unbekapselten, Pneumolysin-defizienten Serotyp 2 Pneumokokkenstammes (*S.p.ΔcpsΔply*) für 6 Stunden resultierte in einer vergleichbar starken Induktion von KLF4 wie durch 1×10^6 cfu/ml eines unbekapselten, Pneumolysin-kompetenten Serotyp 2 Pneumokokkenstammes (*S.p.Δcps*) (siehe Abbildung 7D). Die Induktion von KLF4 scheint also unabhängig von Pneumolysin zu sein.

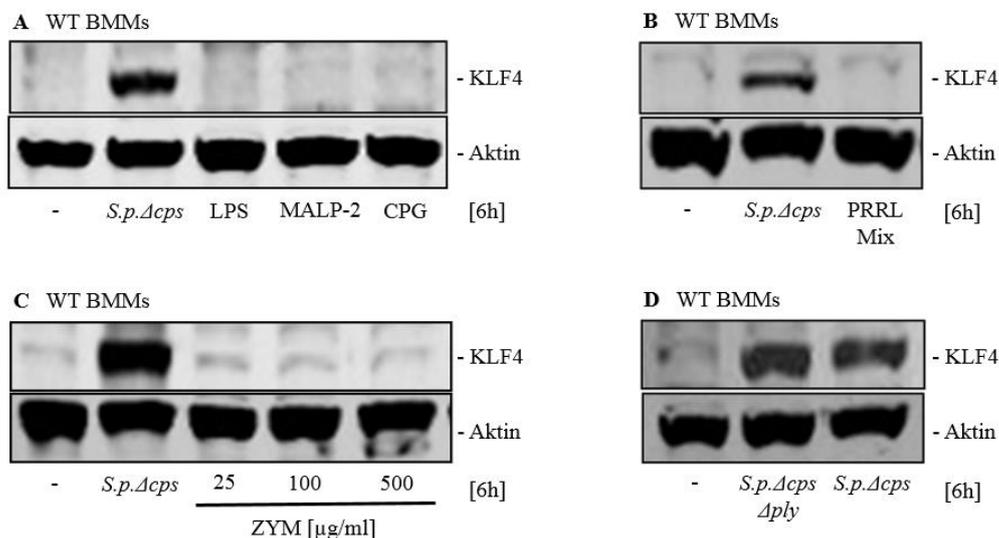


Abbildung 7: Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in BMMs ist unabhängig von TLR2, SIGN-R1 und Pneumolysin

Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* und 0,1 µg/ml LPS, 0,1 µg/ml MALP-2 und 1 µg/ml CPG einzeln (A) bzw. als *pattern recognition receptor ligand* (PRRL)-Mix (bestehend aus 0,1 µg/ml LPS, 0,1 µg/ml MALP-2, 1 µg/ml CPG und 10 µg/ml MDP) (B). Lediglich *S.p.Δcps* induzierte KLF4, nicht jedoch die PRR-Agonisten. Zymosan (ZYM) in verschiedenen Konzentrationen (25-500 µg/ml) induzierte ebenfalls keine Expression von KLF4 in WT BMMs (C). Pneumolysin-defiziente Pneumokokken (*S.p.ΔcpsΔply*) induzierten KLF4 in WT BMMs (D). Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A) und (D) zeigen einen repräsentativen Blot aus 3, (B) und (C) aus 2 unabhängigen Experimenten.

NLRP3 ist ein NLR, der nach Antigenerkennung große, multimere Proteinkomplexe bildet, welche Inflammasome genannt werden [56]. NLRP3 wird durch Pneumolysin von *Streptococcus pneumoniae* aktiviert [69, 77]. Nach Stimulation von WT und NLRP3 KO BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden zeigte sich eine unverändert starke

Expression von KLF4 in NLRP3 KO BMMs im Vergleich zu den korrespondierenden WT BMMs (siehe Abbildung 8A).

Ähnlich verhielt es sich mit ASC KO BMMs. Neben NLRP3 sind weitere Inflammasombildende Rezeptoren an der Erkennung von Pneumokokken beteiligt, wie beispielsweise AIM2 [77]. Zentrales Adapterprotein der Inflammasome ist ASC [113]. Trotz *knockout* von ASC zeigte sich im Western Blot eine im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen unverändert starke Induktion von KLF4 durch 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* (siehe Abbildung 8B). Die Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken scheint also unabhängig von den Inflammasomen zu sein.

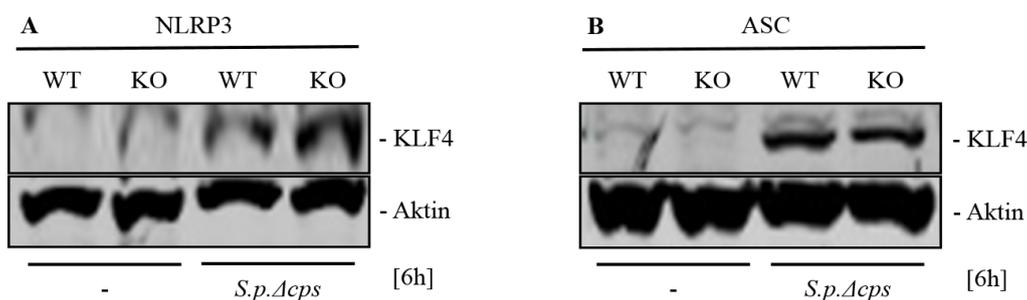


Abbildung 8: Inflammasome sind nicht an der Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in BMMs beteiligt

Stimulation von WT BMMs und NLRP3 KO (A) bzw. ASC KO BMMs (B) mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden. NLRP3 KO und ASC KO BMMs exprimierten KLF4 nach Stimulation vergleichbar stark wie die korrespondierenden WT BMMs. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Blot aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

5.1.4 Bekapselte Pneumokokken induzieren KLF4 in BMMs schwächer, die KLF4-Induktion ist jedoch Phagozytose-unabhängig

Die dicke Polysaccharidkapsel von *Streptococcus pneumoniae* ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor und schützt das Bakterium u.a. durch Maskierung von Oberflächenstrukturen vor einer Phagozytose [24]. Nach Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml eines unbekapselten (*S.p.Δcps*) und eines bekapselten Serotyp 2 Pneumokokkenstammes (D39) für 6 Stunden zeigte sich im anschließenden Western Blot eine schwächere Induktion von KLF4 durch den bekapselten Stamm (siehe Abbildung 9A).

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs mit der Phagozytose wurden WT BMMs für 30 Minuten mit 2 µM Cytochalasin D (Cyto D) vorbehandelt und anschließend für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* stimuliert. Cyto D inhibiert die Phagozytose durch

Blockade der Mikrofilament-Polymerisation [109]. Im Western Blot stellte sich heraus, dass KLF4 in WT BMMs trotz Inhibierung der Phagozytose unverändert durch Pneumokokken induziert wurde (siehe Abbildung 9B). Die erfolgreiche Blockade der Phagozytose wurde mittels Phagozytose-Assay validiert. Die Auswertung ergab nach Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten durchschnittlich 3×10^5 cfu/ml Pneumokokken in den unbehandelten und 0 cfu/ml in den mit Cyto D behandelten BMMs (siehe Abbildung 9C). Die Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs scheint also abhängig von der Kapsel, aber unabhängig von der Phagozytose zu sein.

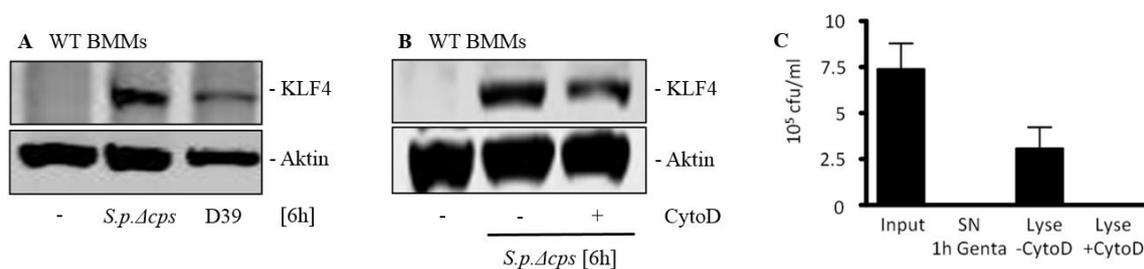


Abbildung 9: Bekapselte Pneumokokken induzieren KLF4 in WT BMMs schwächer, die KLF4-Induktion ist jedoch Phagozytose-unabhängig

Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* und 1×10^6 cfu/ml bekapselten D39 Pneumokokken für 6 Stunden (A). D39 induzierte KLF4 schwächer als *S.p.Acps*. Inkubation von WT BMMs für 30min mit 2 μ M Cytochalasin D (Cyto D) und anschließende Stimulation mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* für 6 Stunden (B). KLF4 wurde trotz Cyto D Behandlung unverändert induziert. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 μ g Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A) und (B) zeigen einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten. Validierung der Phagozytoseinhibierung mittels Phagozytose-Assay (C). Nach 30 minütiger Vorbehandlung mit 2 μ M Cyto D wurden die BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* (Input) für 1 Stunde stimuliert. Anschließend wurde dem Überstand (*supernatant*, SN) 50 μ g/ml Gentamycin für 1 Stunde beigemischt. Der Überstand war danach frei von Pneumokokken (SN 1h Genta). Die BMMs wurden mit PBS gewaschen und mit 1% Saponin lysiert. In nicht mit Cyto D behandelten BMMs (Lyse -CytoD) waren durchschnittlich 3×10^5 cfu/ml und in mit Cyto D behandelten BMMs (Lyse +CytoD) 0 cfu/ml phagozytierte Pneumokokken nachweisbar. (C) zeigt die Zusammenfassung von 3 unabhängigen Experimenten.

5.1.5 Für die Induktion von KLF4 müssen Pneumokokken direkten Kontakt mit den BMMs haben, lebendig sein und replizieren

Im nächsten Schritt wurde die Frage gestellt, ob direkter Kontakt zwischen den Pneumokokken und den BMMs für die Induktion von KLF4 notwendig ist. Dafür wurde ein *Transwell*-System eingesetzt (siehe Abbildung 10A). Dieses besteht aus einer dünnen Membran mit mikroskopisch kleinen Poren (Durchmesser 0,4 μ m), welche eine Pneumokokkensuspension im Überstand von am Boden des Wells adherenten BMMs trennt. Lösliche Faktoren bzw. sezernierte Moleküle können die Membran passieren, ganze

Pneumokokken nicht. Nach Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* ohne und mit *Transwell*-System zeigte sich, dass nur Pneumokokken in direktem Kontakt mit den BMMs (ohne trennende *Transwell*-Membran) KLF4 induzierten (siehe Abbildung 10B).

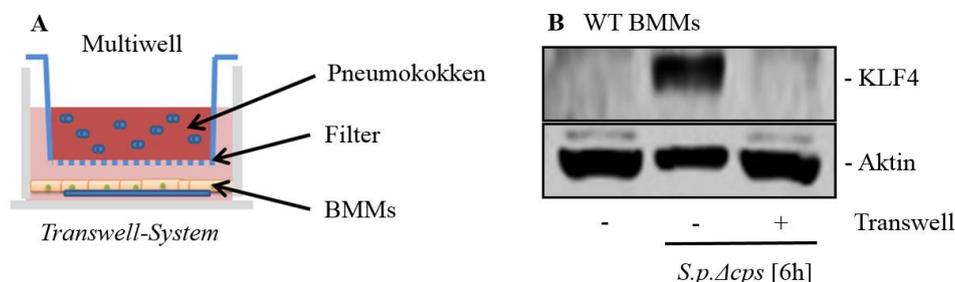


Abbildung 10: Für die Induktion von KLF4 müssen die Pneumokokken direkten Kontakt mit den BMMs haben

Schematische Darstellung eines *Transwell*-Systems (A). Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* ohne bzw. mit *Transwell*-System für 6 Stunden (B). Nur Pneumokokken in direktem Kontakt mit den BMMs induzierten KLF4. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt (40 μ g Gesamtproteinextrakt). Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. (B) zeigt einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten.

Zur Identifikation der Struktur auf der Oberfläche der Pneumokokken, die nach direktem Kontakt für die Induktion von KLF4 in BMMs verantwortlich ist, wurden *S.p.Acps* vor der Stimulation von WT BMMs mit Hitze, Proteinase K (PK), Pronase E (PE), Ethanol oder Natriumperiodat (NaIO_4) behandelt, um bestimmte Oberflächenkomponenten zu denaturieren. Hitze, PK und PE denaturieren proteinerge Oberflächenstrukturen, Ethanol Lipide und NaIO_4 verdaut Kohlenhydratketten. Nach der Behandlung wurden die Pneumokokken auf Blutagarplatten ausplattiert um die Vitalität zu überprüfen. Hitze und Ethanol tötete die Pneumokokken vollständig ab, wohingegen mit PK, PE und NaIO_4 behandelte *S.p.Acps* noch in der Lage waren Kolonien zu bilden.

Anschließend wurden WT BMMs mit den behandelten Pneumokokken stimuliert. Dabei zeigte sich, dass nur lebendige (mit PK, PE und NaIO_4 behandelte) Pneumokokken KLF4 in WT BMMs induzierten, nicht jedoch abgetötete (Hitze und Ethanol) (siehe Abbildung 11A und D). Da mit NaIO_4 behandelte *S.p.Acps* KLF4 in WT BMMs induzieren konnten, scheinen intakte Kohlenhydratketten auf der bakteriellen Oberfläche für eine Induktion von KLF4 nicht erforderlich zu sein.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob neben Lebendigkeit auch bakterielle Replikation für eine Induktion von KLF4 notwendig ist. FCS (fetales Kälberserum, *fetal calf serum*) ist als Bestandteil des bakteriellen Nährmediums für eine Replikation von *S.p.Acps* essenziell (siehe

Abbildung 11B). Nach Stimulation von WT BMMs mit *S.p.Δcps* mit und ohne FCS im Stimulationsmedium zeigte sich, dass nur Pneumokokken in FCS-haltigem Medium KLF4 induzierten (siehe Abbildung 11C und D). Für eine Induktion von KLF4 in BMMs scheinen die Pneumokokken also lebendig sein und replizieren zu müssen.

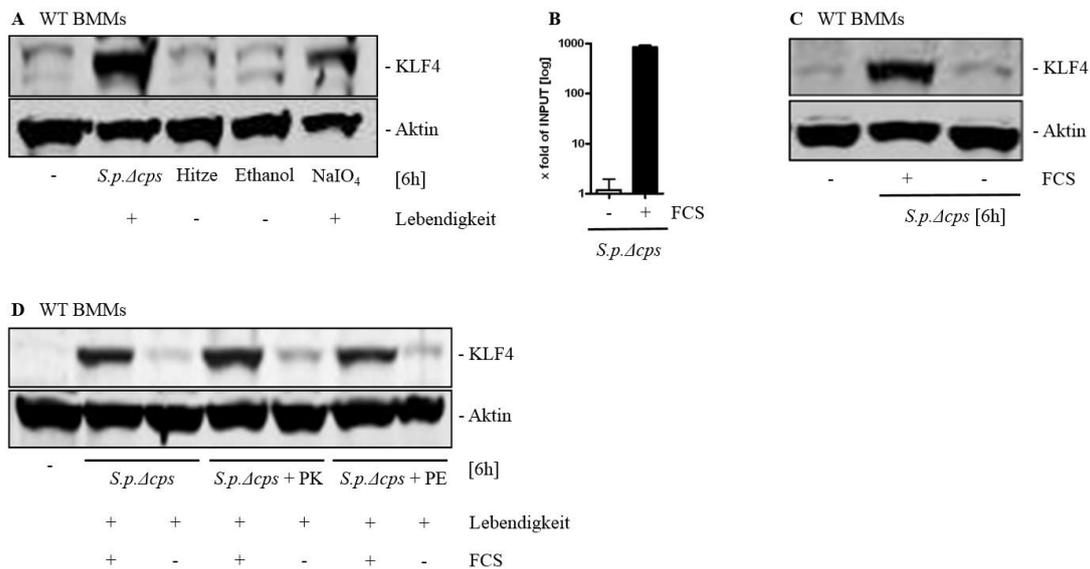


Abbildung 11: Für die Induktion von KLF4 in BMMs müssen die Pneumokokken lebendig sein und replizieren

Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml lebenden (*S.p.Δcps* und NaIO₄-inaktivierte *S.p.Δcps*) bzw. 1×10^7 cfu/ml toten (Hitze- und Ethanol-inaktivierte *S.p.Δcps*) Pneumokokken (A). Nur lebendige Pneumokokken induzierten KLF4. 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* (Input) wurden für 15 Stunden in RPMI ohne oder mit FCS im Brutschrank inkubiert und anschließend auf Blutagarplatten ausplattiert. Am nächsten Morgen erfolgte eine Zählung der gewachsenen Kolonien mit Darstellung als x-faches vom Input (B). Nur Pneumokokken in FCS-haltigem RPMI waren in der Lage Kolonien zu bilden und somit zu replizieren. Die Graphik repräsentiert die durchschnittliche Anzahl an Kolonien \pm Standardfehler des Mittelwertes nach Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten. Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* mit bzw. ohne FCS im Stimulationsmedium (C). Nur replizierende *S.p.Δcps* in FCS-haltigem Medium waren in der Lage KLF4 zu induzieren. Stimulation von WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml lebenden (*S.p.Δcps* und PK- bzw. PE-inaktivierte *S.p.Δcps*) Pneumokokken mit bzw. ohne FCS im Stimulationsmedium (D). Nur lebende und replizierende Pneumokokken induzierten KLF4. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 μ g Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A), (C) und (D) zeigen einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.1.6 Um KLF4 in BMMs zu induzieren, müssen Pneumokokken autolysieren

Die Fähigkeit zur Autolyse ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor der Pneumokokken und eng an den Prozess der Replikation gekoppelt [30]. Autolysin A (LytA) ist das Hauptautolysin von *Streptococcus pneumoniae*. Die durch LytA vermittelte Autolyse setzt Virulenzfaktoren wie Pneumolysin sowie bakterielle Bestandteile wie Nukleinsäuren oder Zellwandfragmente frei, welche potente Aktivatoren von Entzündungszellen wie Makrophagen sind [32].

Um die Frage zu beantworten, ob Pneumokokken nicht nur replizieren sondern auch autolysieren müssen um KLF4 zu induzieren, wurden WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* sowie 1×10^6 cfu/ml eines unbekapselten, LytA-defizienten Serotyp 2 Pneumokokkenstammes (*S.p.AcpsAlytA*) stimuliert (siehe Abbildung 12A). Dabei zeigte sich, dass *S.p.AcpsAlytA* nicht in der Lage war KLF4 in WT BMMs zu induzieren. Pneumokokken müssen also autolysieren und somit wahrscheinlich einen Faktor aus dem Zellinneren freisetzen um KLF4 in BMMs zu induzieren.

Zur Untersuchung der Annahme, dass für die Induktion von KLF4 ein Faktor notwendig ist, der bei der Autolyse der Pneumokokken freigesetzt wird, wurden WT BMMs mit dem Pneumokokken-freien Überstand (*supernatant*, SN) von (LytA-kompetenten) *S.p.Acps* allein und in Kombination mit *S.p.AcpsAlytA* stimuliert (siehe Abbildung 12B). Während beide Komponenten einzeln KLF4 nicht induzierten, führte eine Kombination zu einer erneuten Expression von KLF4. Somit scheint für eine Induktion von KLF4 in BMMs direkter Kontakt mit den Pneumokokken sowie ein Faktor notwendig zu sein, der bei der bakteriellen Autolyse freigesetzt wird.

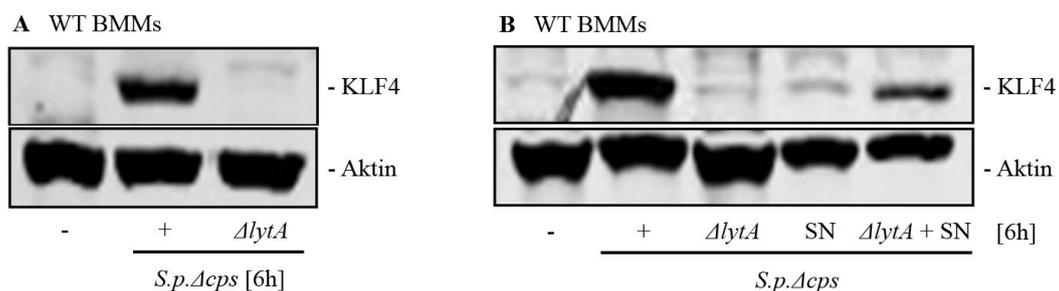


Abbildung 12: Direkter Kontakt zwischen Pneumokokken und BMMs sowie ein bei der bakteriellen Autolyse freigesetzter Faktor sind für die Induktion von KLF4 in BMMs notwendig

Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Acps* bzw. 1×10^6 cfu/ml *S.p.AcpsAlytA* (A). *S.p.AcpsAlytA* war nicht in der Lage KLF4 zu induzieren. Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit dem Pneumokokken-freien Überstand (SN) von *S.p.Acps* allein bzw. in Kombination mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.AcpsAlytA* (B). Weder *S.p.AcpsAlytA*, noch der Überstand von *S.p.Acps* allein induzierten KLF4, jedoch führte die Kombination aus beiden Komponenten zu einer Induktion von KLF4. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 μ g Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A) zeigt einen repräsentativen Blot aus 3 und (B) aus 2 unabhängigen Experimenten.

5.1.7 Für die Induktion von KLF4 in BMMs ist direkter Kontakt mit den Pneumokokken sowie freie DNA notwendig

Durch LytA-vermittelte Autolyse der Pneumokokken werden u.a. bakterielle DNA-Moleküle freigesetzt [32]. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass der DNA erkennende TLR9 zumindest teilweise an der Induktion von KLF4 in BMMs beteiligt ist. Im nächsten

Schritt wurde daher untersucht, ob der durch bakterielle Autolyse freigesetzte und für die Induktion von KLF4 notwendige Faktor eventuell bakterielle DNA ist. Nach Isolation von DNA aus *S.p.Δcps* wurden WT BMMs mit 5 µg bakterieller DNA allein und in Kombination mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* für 6 Stunden stimuliert (siehe Abbildung 13A). Während *S.p.ΔcpsΔlytA* und DNA allein KLF4 nicht induzierten, stellte die Kombination die Expression von KLF4 wieder her. Dieser Effekt konnte durch Verdau der bakteriellen DNA mit 5 Units (U) DNase pro 5 µg DNA vor Stimulation wieder aufgehoben werden (siehe Abbildung 13C). Der erfolgreiche DNase-Verdau wurde mittels Gelelektrophorese verifiziert (siehe Abbildung 13B). Für die Induktion von KLF4 ist also direkter Kontakt zwischen Pneumokokken und BMMs sowie freie bakterielle DNA notwendig.

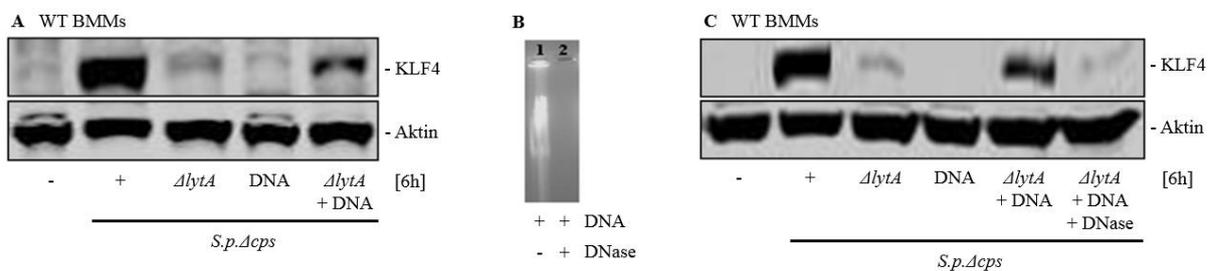


Abbildung 13: Für die Induktion von KLF4 in BMMs ist direkter Kontakt mit den Pneumokokken sowie freie bakterielle DNA notwendig

Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* sowie 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* allein und in Kombination mit 5 µg isolierter DNA von *S.p.Δcps* (A). Während *S.p.ΔcpsΔlytA* sowie DNA allein KLF4 nicht induzierten, stellte die Kombination die Expression wieder her. Anschließend wurde die bakterielle DNA vor Stimulation für 15 Stunden mit 5 U DNase pro 5 µg DNA verdaut. Der erfolgreiche DNase-Verdau wurde mittels Gelelektrophorese nachgewiesen (B). Nach Verdau war die DNA nicht mehr in der Lage KLF4 in Kombination mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* in WT BMMs zu induzieren (C). Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. (A) und (C) zeigen einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten.

Um zu prüfen, ob KLF4 in BMMs auch durch LytA-defiziente Pneumokokken in Kombination mit prokaryotischer DNA aus anderen Bakterien oder eukaryotischer DNA induziert werden kann, wurden WT BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* plus 5 µg isolierter DNA aus *S.p.Δcps* (*S.p.*), *Escherichia coli* (*E.coli*) oder *Staphylococcus aureus* (*S.au.*) bzw. 5 µg muriner oder humaner DNA stimuliert (siehe Abbildung 14A). Dabei zeigte sich, dass *S.p.ΔcpsΔlytA* sowohl in Kombination mit prokaryotischer DNA aus anderen Bakterien als auch in Kombination mit eukaryotischer DNA KLF4 in BMMs induzieren kann.

Eine Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 10 µg isolierter RNA aus *S.p.Δcps* allein oder in Kombination mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* führte nicht zu einer Induktion von KLF4 (siehe Abbildung 14B).

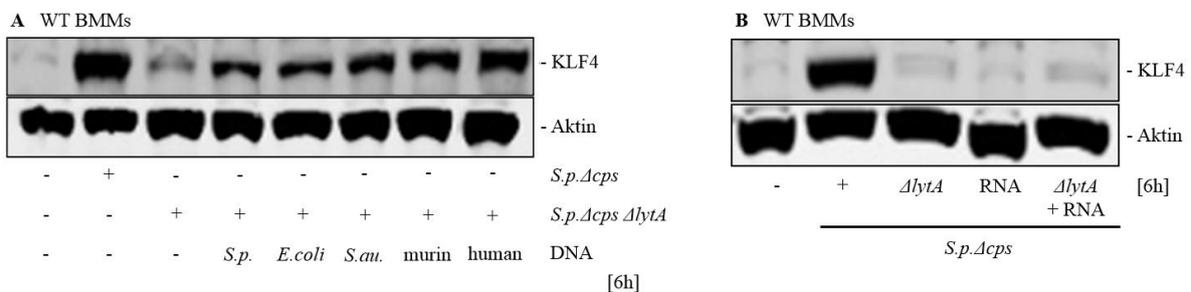


Abbildung 14: LytA-defiziente Pneumokokken induzieren auch in Kombination mit freier pro- oder eukaryotischer DNA aus anderen Organismen KLF4 in BMMs, nicht jedoch mit freier RNA

Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* und 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* allein sowie in Kombination mit 5 µg isolierter DNA aus *S.p.Δcps* (*S.p.*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus aureus* (*S.au.*), Maus (murin) und Mensch (human) (A). Sowohl freie prokaryotische DNA aus *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* als auch freie eukaryotische DNA aus Maus und Mensch induzierten in Kombination mit *S.p.ΔcpsΔlytA* eine Expression von KLF4 in WT BMMs. Eine Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* und 10 µg isolierter RNA aus *S.p.Δcps* einzeln oder in Kombination induzierte hingegen keine KLF4 Expression (B). Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.1.8 Die Induktion von KLF4 in BMMs durch *Streptococcus pneumoniae* ist unabhängig von RAGE und STING

Da freie DNA für die Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs notwendig ist, wurde im nächsten Schritt eine Beteiligung bekannter DNA-erkennender PRRs der Makrophagen untersucht. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint TLR9 an der Induktion von KLF4 beteiligt zu sein. Das Paradigma, dass TLR9 nur durch mikrobielle (CpG-reiche) DNA-Sequenzen aktiviert werden kann, wird schon seit einiger Zeit in Frage gestellt. Auch eukaryotische DNA ist wahrscheinlich in der Lage, TLR9 zu aktivieren [63]. Da Phagozytose für eine erfolgreiche Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken nicht notwendig ist, wird der endolysosomal lokalisierte TLR9 möglicherweise über einen Phagozytose-unabhängigen Weg erreicht und aktiviert. Das bei Nekrose aus Makrophagen freigesetzte *high mobility group box 1 protein* (HMGB1) kann extrazelluläre DNA-Moleküle binden, über den Rezeptor RAGE auf der Oberfläche von Makrophagen in das Endolysosom gelangen und TLR9 aktivieren [57]. Nach Stimulation von WT BMMs und RAGE KO BMMs mit 1×10^6

cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden zeigte sich jedoch, dass RAGE KO BMMs unverändert KLF4 exprimierten (siehe Abbildung 15A). Die Induktion von KLF4 scheint also nicht über RAGE vermittelt zu werden.

STING ist ein wichtiges Adapterprotein der zytosolischen DNA-Erkennung in Makrophagen und in Signalwege zahlreicher, teilweise noch unbekannter DNA-erkennenden Rezeptoren verschaltet [114]. STING KO BMMs exprimierten jedoch nach Stimulation mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden im Vergleich zu den korrespondierenden WT BMMs unverändert KLF4 (siehe Abbildung 15B). STING ist also ebenfalls nicht an der Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken beteiligt.

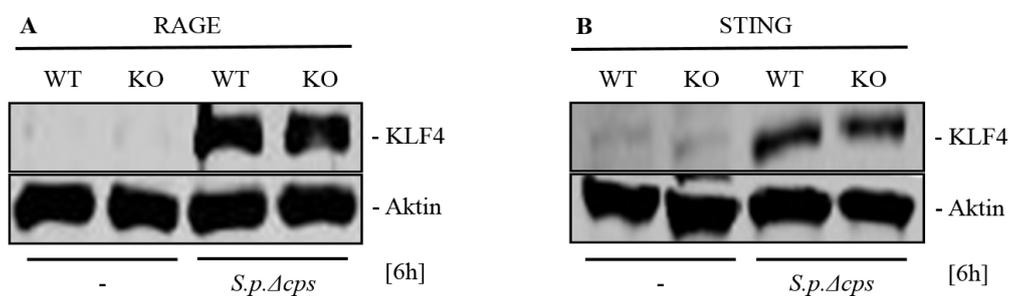


Abbildung 15: Die Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs ist unabhängig von RAGE und STING

Stimulation von WT BMMs und RAGE KO BMMs (A) bzw. STING KO BMMs (B) mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden. Es zeigte sich, dass sowohl RAGE KO als auch STING KO BMMs KLF4 vergleichbar stark wie die korrespondierenden WT BMMs exprimierten. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Blot aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

5.1.9 Die Induktion von KLF4 in BMMs durch *Streptococcus pneumoniae* ist unabhängig von Typ 1 Interferonen

Streptococcus pneumoniae induziert hauptsächlich über eine Aktivierung zytosolischer DNA-Rezeptoren die Bildung von Typ 1 Interferonen (IFNs) in Makrophagen, welche über den nahezu von allen Zelltypen exprimierten Interferon- α/β Rezeptor (IFNAR) sowohl auto- als auch parakrin die Expression von IFN-stimulierten Genen (ISGs) steuern [77, 103]. Da für eine Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken die Erkennung freier DNA-Moleküle notwendig ist, wurde nun geprüft, ob diese Induktion von einer Typ 1 IFN Antwort abhängig ist. Eine Stimulation von WT und IFNAR KO BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden führte jedoch zu einer vergleichbar starken Expression von KLF4 in den IFNAR KO BMMs wie in den korrespondierenden WT BMMs (siehe Abbildung 16A). Eine

Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 500 U/ml IFN β allein oder in Kombination mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* führte nicht zu einer Induktion von KLF4 (siehe Abbildung 16B). Somit scheint die Pneumokokken-vermittelte Induktion von KLF4 in BMMs unabhängig von Typ 1 IFNs zu sein.

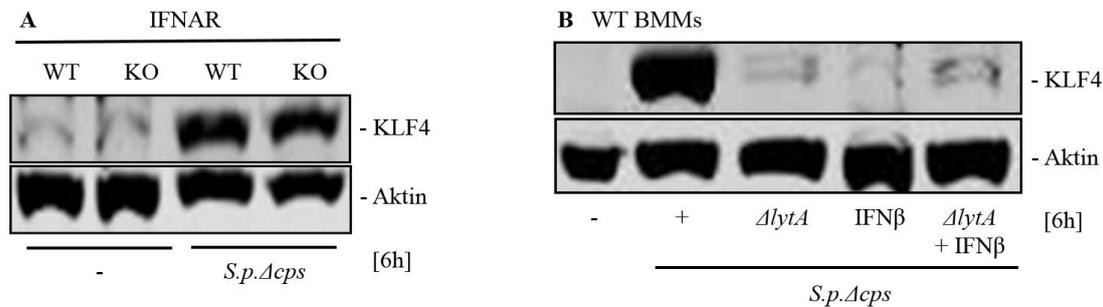


Abbildung 16: Die Induktion von KLF4 durch *Streptococcus pneumoniae* in BMMs ist unabhängig von IFNAR und IFN β

Stimulation von WT BMMs und IFNAR KO BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* für 6 Stunden (A). IFNAR KO BMMs exprimierten KLF4 vergleichbar stark wie die korrespondierenden WT BMMs. Stimulation von WT BMMs für 6 Stunden mit 500 U/ml IFN β allein und in Kombination mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.ΔcpsΔlytA* (B). IFN β war nicht in der Lage KLF4 zu induzieren, auch nicht in Kombination mit *S.p.ΔcpsΔlytA*. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für die Western Blots wurden 40 μ g Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Blot aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

5.2 Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor KLF4 eine Rolle bei der Immunantwort in Makrophagen spielt. Ob KLF4 eher pro- oder antiinflammatorische Signalwege in Makrophagen fördert, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden [85, 93, 95, 96].

In der Pneumokokkenpneumonie steuert KLF4 in Bronchialepithelzellen die Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, was wahrscheinlich die Entzündungsreaktion eindämmt und einer entzündungsbedingten Schädigung des Lungengewebes entgegenwirkt [97]. Ob KLF4 bei einer Infektion mit Pneumokokken auch in Makrophagen eine funktionelle Bedeutung für die Immunantwort hat, ist bislang nicht untersucht.

Um diese Frage zu beantworten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit BMMs aus *in vivo* mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelten ERT-Cre^{-/-}/KLF4^{loxPloxP} Mäusen (KLF4 WT) und ERT-Cre^{+/-}/KLF4^{loxPloxP} Mäusen (KLF4 KD) isoliert. Der erfolgreiche *knockdown* (KD) von KLF4 wurde nach Stimulation der BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p.Δcps* im Western Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 17).

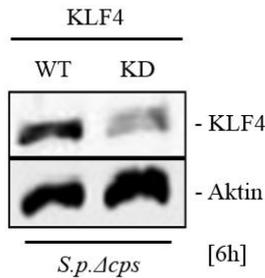


Abbildung 17: Nachweis des KLF4 knockdown im Western Blot

Stimulation von KLF4 WT und KLF4 KD BMMs mit 1×10^6 cfu/ml *S.p. Δcps* für 6 Stunden. Die Expression von KLF4 wurde mittels Western Blot dargestellt. Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Kammern. Für den Western Blot wurden 40 µg Gesamtproteinextrakt aufgetragen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot aus 2 unabhängigen Experimenten.

5.2.1 KLF4 KD BMMs imponieren nach Stimulation mit Pneumokokken stärker morphologisch verändert als KLF4 WT BMMs

Vor und nach der Stimulation von KLF4 WT und KLF4 KD BMMs mit 1×10^6 cfu/ml bekapselten D39 Serotyp 2 Pneumokokken für 6 Stunden erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der BMMs (siehe Abbildung 18A bis D).

Vor der Stimulation konnte kein Unterschied festgestellt werden. Nach der Stimulation zeigten sich deutlich weniger KLF4 KD als KLF4 WT BMMs am Wellboden adhären. Die KLF4 KD BMMs imponierten zudem morphologisch stärker verändert (abgerundet, vereinzelt), vereinbar mit einem größeren Ausmaß an Zelltod.

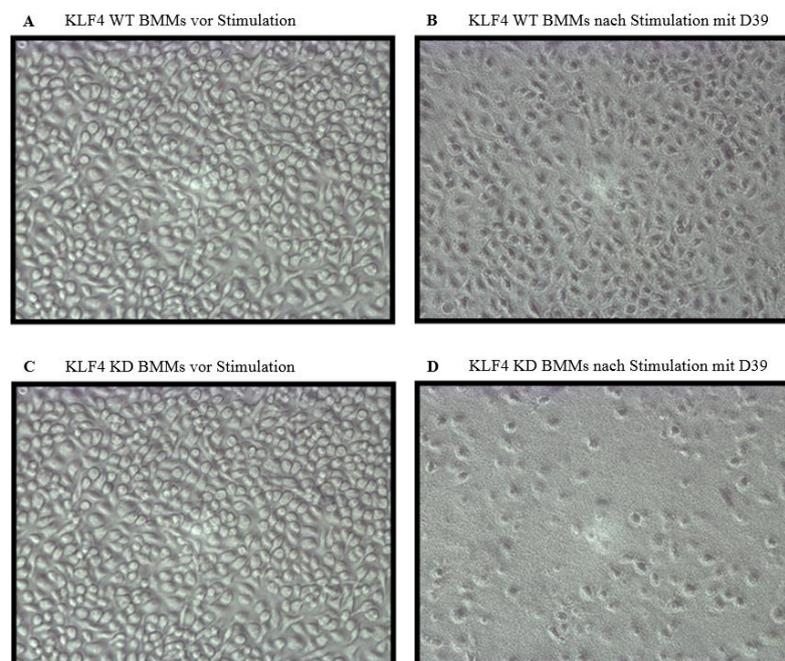


Abbildung 18: KLF4 KD BMMs erscheinen nach Stimulation mit Pneumokokken stärker morphologisch verändert

Stimulation von KLF4 WT und KLF4 KD BMMs mit 1×10^6 cfu/ml D39 für 6 Stunden und lichtmikroskopische Darstellung der Zellen mittels IMT-2 (Olympus, Vergrößerung 10 x 20). Vor Stimulation zeigte sich kein Unterschied zwischen den KLF4 WT (A) und KLF4 KD BMMs (C). Nach Stimulation imponierten die KLF4 KD BMMs (D) morphologisch stärker verändert als die KLF4 WT BMMs (B).

5.2.2 KLF4 steigert die Bildung von KC und reduziert die Ausschüttung von IL-10 durch BMMs bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Zur Untersuchung eines eventuellen Einflusses von KLF4 auf die Zytokinbildung der BMMs bei Pneumokokkeninfektion wurden KLF4 WT und KLF4 KD BMMs mit 1×10^6 cfu/ml D39 Pneumokokken für 6 bzw. 15 Stunden stimuliert und anschließend im Überstand mittels ELISA die Konzentration der Zytokine KC (das murine Homolog zum humanen IL-8) und IL-10 bestimmt.

KLF4 KD BMMs bildeten sowohl nach 6 als auch nach 15 Stunden Stimulation mit D39 signifikant weniger KC als KLF4 WT BMMs (siehe Abbildung 19A). Die Ausschüttung von IL-10 durch KLF4 KD BMMs war nach 6 und 15 Stunden deutlich gesteigert, auch wenn das Ergebnis nach N=4 Wiederholungen nicht signifikant war (siehe Abbildung 19B).

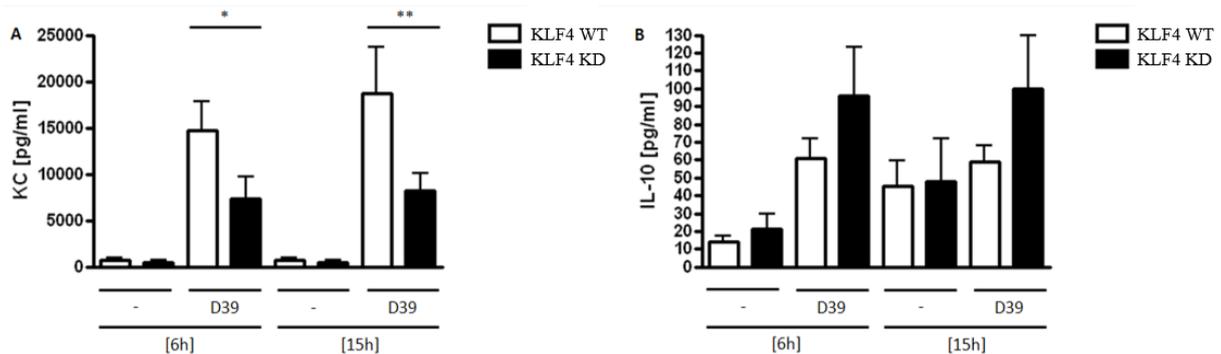


Abbildung 19: KLF4 steigert die Bildung von KC und reduziert die Bildung von IL-10 durch BMMs bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Stimulation von KLF4 WT (weiße Balken) und KLF4 KD BMMs (schwarze Balken) für 6 und 15 Stunden mit 1×10^6 cfu/ml D39 und Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA. KLF4 KD BMMs bildeten nach 6 und 15 Stunden signifikant weniger KC (A) und deutlich mehr IL-10 (B) als KLF4 WT BMMs. N=4. Statistik: One way ANOVA und Newman Keuls Post Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6. Diskussion

Streptococcus pneumoniae ist der Haupterreger der ambulant erworbenen Pneumonie [1, 5]. Der Erreger gelangt wahrscheinlich hauptsächlich durch Aspiration in die Lunge [13]. Das Überleben des Patienten hängt dabei sowohl von einer robusten Immunabwehr als auch von einer effektiven Kontrolle der Immunantwort zur Reduktion von Kollateralschäden an körpereigenem Lungengewebe ab [68, 97]. Der Transkriptionsfaktor KLF4 wird von einer Vielzahl von Immun- und Nichtimmunzellen exprimiert und steuert neben Zellzyklus und Apoptose auch grundlegende Mechanismen der Immunabwehr [83]. Zahlten et al. konnten zeigen, dass KLF4 in Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) durch Pneumokokken über TLR9 und die Src-Kinasen induziert wird und die Ausschüttung von IL-10 steigert, was wahrscheinlich zur Reduktion von Kollateralschäden die Entzündungsreaktion eindämmt [97]. Alveolarmakrophagen sind ein fundamentaler Bestandteil der ersten Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene [115]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass KLF4 in Makrophagen dosisabhängig durch *Streptococcus pneumoniae* induziert wird und in diesen Zellen möglicherweise eine proinflammatorische Rolle spielt.

6.1 Induktion von KLF4 in Makrophagen durch *Streptococcus pneumoniae*

Die Untersuchung des Signalweges, über den *Streptococcus pneumoniae* KLF4 in Makrophagen induziert, erfolgte in murinen, aus Knochenmarkszellen differenzierten Makrophagen (BMMs). Es zeigte sich dabei ein ungewöhnlicher, zweiteiliger Mechanismus: Für eine erfolgreiche Induktion von KLF4 in BMMs ist sowohl direkter Kontakt der Makrophagen mit den Pneumokokken als auch das Vorhandensein von freier pro- und/oder eukaryotischer DNA notwendig. Im folgenden Abschnitt werden diese beiden Bestandteile des Induktionsmechanismus Komponente ‚Kontakt‘ bzw. Komponente ‚freie DNA‘ genannt. Nur beide Komponenten zusammen (nicht jedoch einzeln) induzieren KLF4. Zunächst werden die gewonnenen Ergebnisse den beiden Komponenten zugeordnet. Anschließend werden die Komponenten unabhängig voneinander betrachtet. Zum Schluss soll die mögliche Bedeutung der Zweiteiligkeit des Induktionsmechanismus erörtert werden.

6.1.1 Zuordnung der Ergebnisse zur Komponente ‚Kontakt‘ bzw. ‚freie DNA‘

Die erste Herausforderung besteht darin, die gewonnenen Ergebnisse einer der beiden Komponenten des Induktionsmechanismus zuzuordnen: Nur *autolysierende, lebendige* und *replizierende* Pneumokokken in *direktem Kontakt* mit den BMMs induzieren KLF4. *Bekapselte* Pneumokokken induzieren KLF4 weniger stark als unbekapselte Mutanten, eine *Phagozytose* ist nicht notwendig.

6.1.1.1 Autolyse

Die Autolysin LytA-vermittelte Autolyse der Pneumokokken setzt u.a. bakterielle Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan und Teichonsäureketten frei, die immunwirksame Signalwege in Makrophagen aktivieren [116]. Für die Induktion von KLF4 in Makrophagen scheint die Autolyse jedoch hauptsächlich zur Freisetzung von DNA-Molekülen notwendig zu sein. Während LytA-defiziente Pneumokokken KLF4 in BMMs nicht induzieren, stellt die Substitution von freien pro- und/oder eukaryotischen DNA-Molekülen zum Versuchsansatz die Induktion von KLF4 wieder her (siehe Kapitel 5.1.7). Zum einen setzt die LytA-vermittelte Autolyse die prokaryotische DNA aus den Pneumokokken selbst frei [32]. Zum anderen bewirkt sie die Freisetzung zytotoxischer Substanzen wie Wasserstoffperoxid aus dem Inneren der Pneumokokken. Diese Substanzen induzieren Nekrose von Wirtszellen (bzw. von BMMs im Versuchsansatz) und setzen damit eukaryotische DNA-Molekülen frei [117, 118], die von benachbarten BMMs erkannt werden können. Die Autolyse kann somit der Komponente ‚freie DNA‘ des Induktionsmechanismus zugeordnet werden.

6.1.1.2 Lebendigkeit

Nur lebendige Pneumokokken induzieren KLF4 in BMMs (siehe Kapitel 5.1.5). Auch diese Beobachtung ist wahrscheinlich der Komponente ‚freie DNA‘ zuzuordnen, denn nur lebendige Pneumokokken autolysieren, setzen ihre DNA frei [32] und induzieren nekrotischen Zelltod von Wirtszellen [117].

6.1.1.3 Replikation

Für eine Induktion von KLF4 in BMMs müssen die Pneumokokken replizieren (siehe Kapitel 5.1.5). Die Replikation ist eng mit der bakteriellen Autolyse verknüpft [30]. Dennoch liegt die Ursache für die fehlende Induktion von KLF4 durch nicht replizierende Pneumokokken in

FCS-freiem Medium wahrscheinlich in einer veränderten Komponente ‚Kontakt‘. LytA autolysiert die Pneumokokken hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase [32]. Folglich sollten die Pneumokokken auch in FCS-freiem Medium autolysieren und ihre DNA sowie Zytotoxine freisetzen. Der Faktor Replikation wird also der Komponente ‚Kontakt‘ zugeordnet.

6.1.1.4 Kontakt

Nur Pneumokokken in direktem Kontakt mit den BMMs induzieren KLF4 (siehe Kapitel 5.1.5). Diese Beobachtung ist einerseits bedeutsam (und namensgebend) für die Komponente ‚Kontakt‘. Zum anderen ist unmittelbare räumliche Nähe zwischen Pneumokokken und Makrophagen wahrscheinlich auch für die Komponente ‚freie DNA‘ wichtig. Extrazelluläre DNA-Moleküle werden zügig von körpereigenen und bakteriellen DNasen abgebaut [119]. Wasserstoffperoxid aus den Pneumokokken wird zur Reduktion der zytotoxischen Wirkung durch von Makrophagen sezernierte Katalasen detoxifiziert [120].

Kontakt zwischen Pneumokokken und BMMs *erhöht* also die Wahrscheinlichkeit, dass freie bakterielle DNA von Makrophagen erkannt werden kann. Zudem *verringert* Kontakt die Wahrscheinlichkeit, dass Substanzen wie Wasserstoffperoxid inaktiviert werden, bevor sie ihre zytotoxische Wirkung entfalten und eukaryotische DNA freisetzen können, die zur Induktion von KLF4 in benachbarten Makrophagen beitragen kann. Direkter Kontakt wird somit sowohl der Komponente ‚Kontakt‘ als auch der Komponente ‚freie DNA‘ zugeordnet.

6.1.1.5 Kapsel

Bekapselte Pneumokokken induzieren KLF4 in BMMs weniger stark als kapsellose Mutanten (siehe Kapitel 5.1.4). Auch diese Beobachtung kann wahrscheinlich beiden Komponenten zugeordnet werden. Die dicke Polysaccharidkapsel maskiert die Strukturen der bakteriellen Zellwand [24]. Dies schützt die Erreger vor Phagozytose [24], was aber für die Induktion von KLF4 nicht relevant zu sein scheint (siehe Kapitel 5.1.4). Vielmehr ist zu vermuten, dass die Komponente ‚Kontakt‘ aus der Erkennung eines PAMPs auf der bakteriellen Zellwand besteht, der möglicherweise durch die Kapsel zumindest teilweise maskiert wird. Teilweise deshalb, weil auch bekapselte Erreger KLF4 in Makrophagen (wenn auch schwächer) induzieren können. Entweder ist dies durch die von Hammerschmidt et al. beschriebene Reduktion der Kapseldicke durch die Pneumokokken mit Freilegung von Zellwandstrukturen bei direktem Kontakt mit Wirtszellen erklärbar [26] oder aber die Maskierung der

entsprechenden Struktur ist tatsächlich unvollständig. Als Beispiel für eine solche Struktur kann das Cholin-bindene Protein PspA (engl. „*pneumococcal surface protein A*“) genannt werden, welches aufgrund seiner unvollständigen Kapselmaskierung als Kandidat für einen neuen Impfstoff gegen *Streptococcus pneumoniae* untersucht wird [121]. PspA ist in der Zellwand der Pneumokokken verankert und überragt die Kapsel mit seinem N-terminalen Pol [22]. Es ist bekannt, dass PspA in Monozyten über NF- κ B und MAPKs immunwirksame Signalwege aktiviert, was zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-8 führt [122]. Inwieweit PspA auch an der Induktion von KLF4 beteiligt ist, sollte im Rahmen zukünftiger Experimente untersucht werden (siehe Kapitel 6.4).

Bekapselte Pneumokokken weisen eine geringere Autolyserate als unbekapselte Stämme auf, was u.a. mit einer reduzierten Expression von LytA durch bekapselte Pneumokokken begründet wird [123]. Somit setzen bekapselte Pneumokokken wahrscheinlich weniger bakterielle DNA und zytotoxische Substanzen frei, was ebenfalls dazu beitragen kann, dass bekapselte Pneumokokken KLF4 in BMMs schwächer induzieren. Somit wird die Kapsel beiden Komponenten des Induktionsmechanismus zugeordnet.

6.1.1.6 Phagozytose

Für eine Induktion von KLF4 müssen die Pneumokokken zwar in direktem Kontakt mit den BMMs sein, jedoch nicht phagozytiert werden (siehe Kapitel 5.1.4). Dies legt sowohl für die Komponente ‚Kontakt‘ als auch die Komponente ‚freie DNA‘ den Schluss nahe, dass die beteiligten Rezeptoren auf der Oberfläche bzw. Außenseite der Makrophagen lokalisiert sind. Insbesondere für die freie DNA ist jedoch auch ein alternativer, Phagozytose-unabhängiger Internalisierungsweg mit anschließender Erkennung durch einen intrazellulären Rezeptor denkbar (siehe Kapitel 6.1.3).

6.1.2 Die Komponente ‚Kontakt‘ des Induktionsmechanismus

Über die Komponente ‚Kontakt‘ des KLF4-Induktionsmechanismus kann also gesagt werden, dass diese vermutlich aus der Erkennung eines zumindest teilweise durch die Kapsel maskierten PAMPs auf der Zellwand der Pneumokokken durch einen wahrscheinlich auf der Außenseite der Plasmamembran der Makrophagen lokalisierten Rezeptor besteht. Diese Erkennung scheint von der bakteriellen Replikation abzuhängen.

PAMPs werden durch PRRs (engl. „*pattern recognition receptors*“) erkannt [40, 56]. Obwohl TLR2 und TLR4 an der Erkennung von Pneumokokken durch Makrophagen beteiligt

sind [74, 75], induzierte eine Stimulation von WT BMMs mit dem TLR2 Liganden Malp-2 oder dem TLR4 Liganden LPS keine Expression von KLF4, auch nicht in Kombination mit CpG (siehe Kapitel 5.1.3). Der bakterielle Virulenzfaktor Pneumolysin aktiviert wahrscheinlich ebenfalls TLR4 [75, 124]. Passend zu den Stimulationsversuchen mit LPS zeigte sich, dass Pneumolysin für eine Induktion von KLF4 in BMMs nicht notwendig ist (siehe Kapitel 5.1.3). Liao et al. beobachteten sogar, dass eine vorhandene Expression von KLF4 in Peritoneal-Makrophagen und BMMs durch LPS über TLR4 reduziert wird [96]. Feinberg et al. und Liu et al. widersprechen jedoch diesen Ergebnissen. Sie beobachteten eine Induktion von KLF4 durch LPS in Makrophagen [94, 95]. Da KLF4 einen starken Einfluss auf die Differenzierung von Makrophagen hat [85, 93] und abhängig vom betroffenen Gewebe als Onkogen oder Tumorsuppressor an der Entstehung maligner Tumore beteiligt ist [83], könnte sich die Regulation der KLF4 Expression in auf Tumorzellen zurückgehende Makrophagen-Zelllinien von der Regulation in Primärzellen erheblich unterscheiden. Die widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf die Induktion von KLF4 durch LPS könnten somit durch den Einsatz von Primärmakrophagen (in dieser Studie sowie [96]) bzw. humanen oder murinen Makrophagen-Zelllinien (THP1 [94] oder RAW264.7 [95]) erklärt werden. Zudem wurde LPS von verschiedenen Erregern verwendet. In dieser Studie wurde LPS von *Salmonella minnesota* eingesetzt, wohingegen Feinberg et al. LPS von *Salmonella typhi* [94] und Liu et al. LPS von *Escherichia coli* [95] benutzten. Auch unterschiedliche Stimulationszeiträume und Konzentrationen von LPS (von 25 bis 500 ng/ml über 2 bis 24 Stunden) könnten abweichende Ergebnisse erklären. Obwohl LPS-freie Reaktionsgefäße benutzt wurden, kann eine vorübergehende LPS-Toleranz der in dieser Studie verwendeten BMMs durch eine Verunreinigung der Reaktionsgefäße mit LPS ebenfalls nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Exposition gegenüber geringer Dosen von LPS kann zu einer transienten Resistenz der Makrophagen gegenüber anschließender Behandlung mit hohen Dosen von LPS führen. Dieses Phänomen wird als „Endotoxintoleranz“ bezeichnet [125]. Da die Versuche mindestens dreimal unabhängig voneinander an verschiedenen Tagen mit jeweils frischen Reaktionsgefäßen wiederholt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit einer zugrundeliegenden Endotoxintoleranz allerdings sehr klein.

Wenngleich auf der Außenseite der Plasmamembran von Makrophagen lokalisiert und an der Erkennung von Pneumokokken beteiligt, sind der Mannose-Rezeptor MMR (engl. „*macrophage mannose receptor*“), der Scavenger-Rezeptor MARCO (engl. „*macrophage receptor with collagenous structure*“) und der C-Typ Lektinrezeptor SIGN-R1 (engl. „*specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1*“) wahrscheinlich ebenfalls nicht die verantwortlichen

PRRs für die Komponente ‚Kontakt‘ des Induktionsmechanismus. Denn ihre Aufgabe besteht nach Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* in der Initiierung einer Phagozytose der Erreger [73, 126, 127], welche für die Induktion von KLF4 nicht notwendig ist. Aufgrund dieser Tatsache ist es außerdem verständlich, dass intrazelluläre Rezeptoren zur Erkennung von bakteriellen PAMPs wie NOD2 [77] oder das NLRP3-Inflammasom [69] nicht an der Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken beteiligt sind (siehe Kapitel 5.1.3).

Über den PAMP der Komponente ‚Kontakt‘ auf der Zellwand der Pneumokokken lässt sich schlussfolgern, dass es sich wahrscheinlich nicht um ein Peptidoglykan (Erkennung durch TLR2 [73] und NOD2 [77]), nicht um ein Lipoprotein (Erkennung durch TLR2/TLR6 [128]), nicht um eine Teichonsäure (Erkennung durch TLR2 [73]) und nicht um ein Polysaccharid (Erkennung durch MMR [126] und SIGN-R1 [127]) handelt. Über den PRR der Komponente ‚Kontakt‘ auf der Außenseite der Plasmamembran der Makrophagen lässt sich sagen, dass es sich entweder um einen unbekanntes PRR oder einen bekannten PRR handelt, von dem jedoch bisher nicht bekannt ist, dass er Pneumokokken erkennt.

Sehr interessant für die Komponente ‚Kontakt‘ sind außerdem die Stimulationsversuche mit verschiedenartig behandelten Pneumokokken (siehe Kapitel 5.1.5). Es bestätigt sich, dass der gesuchte PAMP auf der Zellwand der Pneumokokken wahrscheinlich kein Polysaccharid ist, denn Polysaccharide werden durch NaIO_4 verdaut, was keinen Einfluss auf die Induktion von KLF4 hatte. Proteinase K bzw. Pronase E denaturieren oberflächliche Proteinstrukturen, ohne die Pneumokokken abzutöten. Die Behandlung mit Proteinase K bzw. Pronase E erfolgte in der stationären Wachstumsphase der Pneumokokken. Bemerkenswert ist, dass replizierende Pneumokokken in FCS-haltigem Medium auch nach Behandlung mit Proteinase K oder Pronase E noch KLF4 induzierten, wohingegen nicht replizierende, identisch behandelte Erreger dazu nicht mehr in der Lage waren. Es könnte also sein, dass der gesuchte PAMP ein Protein ist, das lediglich im Verlauf der bakteriellen Replikation auf der Zellwand der Pneumokokken exprimiert wird, nicht jedoch in der stationären Wachstumsphase. Ein Beispiel für ein solches Protein ist CbpE (engl. „*choline-binding protein E*“), das vor allem in der logarithmischen und kaum in der stationären Wachstumsphase von *Streptococcus pneumoniae* exprimiert wird [129]. Die Frage, ob CbpE der gesuchte PAMP ist, sollte Gegenstand weiterführender Experimente in diesem Projekt sein (siehe Kapitel 6.4).

Zusammenfassend kann also über die Komponente ‚Kontakt‘ des Induktionsmechanismus gesagt werden, dass es sich wahrscheinlich um die Erkennung eines PAMPs auf der Zellwand der Pneumokokken durch einen PRR der Makrophagen handelt, der auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert ist. Der PAMP wird vermutlich teilweise durch die Kapsel maskiert und v.a. während der bakteriellen Replikation exprimiert. Für die Erkennung des PAMP scheint Kontakt zwischen Pneumokokken und Makrophagen Voraussetzung zu sein. Der PAMP ist offenbar kein Peptidoglykan, kein Lipoprotein, kein Polysaccharid und keine Teichonsäure.

6.1.3 Die Komponente ‚freie DNA‘ des Induktionsmechanismus

Neben der Komponente ‚Kontakt‘ sind freie DNA-Moleküle (Komponente ‚freie DNA‘) für eine Induktion von KLF4 in BMMs durch *Streptococcus pneumoniae* notwendig.

Ungewöhnlich ist dabei zunächst die Beobachtung, dass pro- und eukaryotische DNA-Moleküle in Kombination mit LytA-defizienten Pneumokokken KLF4 in BMMs vergleichbar stark induzieren (siehe Kapitel 5.1.7). Stacey et al. schreiben eukaryotischer DNA eine geringere „immunstimulatorische Potenz“ zu [130]. Zu erwarten wäre daher im Versuchsansatz mit eukaryotischer DNA eine geringere oder sogar fehlende Induktion von KLF4 gewesen. Als „immunstimulatorisches Element“ der DNA identifizierten Krieg et al. primär unmethylierte CpG-Dinukleotidsequenzen [131]. Die Tatsache, dass diese Sequenzen im eukaryotischen Genom sehr viel seltener sind [131], das Vorhandensein inhibitorischer DNA-Motive [130, 132] und eine schneller gesättigte Aufnahme durch Immunzellen wie Makrophagen [130, 133] werden als Begründung für die geringere „immunstimulatorische Potenz“ eukaryotischer DNA-Moleküle im Vergleich mit freier prokaryotischer DNA angeführt. Wie ist es also zu erklären, dass pro- und eukaryotische DNA in Hinblick auf die Induktion von KLF4 vergleichbar „potent“ sind? Stacey et al. messen „immunstimulatorische Potenz“ an der Aktivierung von NF- κ B in RAW264.7 Makrophagen [130]. Obwohl für KLF4 und NF- κ B eine wechselseitige Beeinflussung bekannt ist [94, 134], schließt eine fehlende Aktivierung von NF- κ B durch eukaryotische DNA eine „potente“ Induktion von KLF4 nicht aus. Zudem konnte gezeigt werden, dass eukaryotische DNA durchaus nicht immunologisch inert ist [133, 135-138]. Vielmehr wird der Zugang freier eukaryotischer DNA zu (zumeist intrazellulär lokalisierten) DNA-Rezeptoren von Immunzellen wie Makrophagen durch effektive Schutzmechanismen wie unmittelbaren Abbau durch wirtseigene DNasen verhindert [57, 137, 139]. Murine Peritoneal- und RAW264.7 Makrophagen bildeten äquivalente

Mengen TNF α nach Stimulation mit pro- und eukaryotischen DNA-Molekülen, wenn diese durch Kopplung an kationische Liposomen gleichermaßen ins Zellinnere aufgenommen wurden [140]. Nach Lipofektion aktivierte eukaryotische DNA sogar NF- κ B [135]. Für die Komponente ‚freie DNA‘ des Induktionsmechanismus kann also geschlossen werden, dass die Erkennung der freien DNA entweder durch einen PRR erfolgt, der sowohl für pro- als auch eukaryotische DNA zugänglich und sensitiv ist. Oder die pro- bzw. eukaryotischen DNA-Moleküle werden durch verschiedene PRRs erkannt, die additiv oder womöglich teilweise redundant an der Induktion von KLF4 beteiligt sind (siehe Kapitel 6.1.4).

Interessant ist zudem, dass nach Verdau der DNA mit DNase KLF4 nicht mehr induziert wird (siehe Kapitel 5.1.7). DNase spaltet doppelsträngige DNA-Moleküle in kurze, einzelsträngige Fragmente < 10 bp oder Nukleotide. Möglicherweise ist daher eine bestimmte Länge der DNA-Moleküle, das Vorhandensein bestimmter Sequenzen und/oder Doppelsträngigkeit Voraussetzung für eine Induktion von KLF4. Roberts et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von iNOS zur Bildung von Stickstoffradikalen in BMMs und RAW264.7 Makrophagen durch prokaryotische DNA kritisch von der Länge der präsentierten DNA-Fragmente abhängt [141]. Längere Fragmente werden effizienter von Makrophagen internalisiert und weisen eine höhere Stabilität gegenüber DNasen auf (u.a. weil eine Endonuklease bei Spaltung längerer DNA-Fragmente weniger wahrscheinlich ein CpG-Motiv zerstört) [141]. Wu et al. beobachteten, dass für eine erfolgreiche Aktivierung von TLR9 in BMMs neben CpG eine spezifische, Guanin-reiche Sequenz am 3'-Terminus des DNA-Fragments notwendig ist [142]. Diese Sequenz ermöglicht durch Quervernetzung die erforderliche Multimerisierung von TLR9 [142]. Eine Reihe von Studien haben den Einfluss der Doppelsträngigkeit auf die Aktivierung zytosolischer DNA-Rezeptoren untersucht [135, 136, 143]. So bilden beispielsweise murine Monozyten nach Transfektion von doppelsträngigen, nicht jedoch einzelsträngigen (pro- oder eukaryotischen) DNA-Fragmenten Typ 1 IFNs [143]. Inwieweit diese strukturellen Eigenschaften der freien DNA-Moleküle auch für die Induktion von KLF4 in BMMs bedeutsam sind, sollte Gegenstand zukünftiger Experimente sein (siehe Kapitel 6.4).

Eine Kombination von LytA-defizienten Pneumokokken mit freier bakterieller RNA führte nicht zur Induktion von KLF4 in BMMs (siehe Kapitel 5.1.7). Dies ist insofern nicht verwunderlich, als das freie DNA und RNA mittels verschiedener PRRs von Makrophagen erkannt werden [56, 57]. Dennoch könnte diese Beobachtung auch bedeuten, dass für eine Induktion von KLF4 die Erkennung einer Thymidin-reichen Nukleotid-Sequenz erforderlich ist. RNA enthält kein Thymidin [99]. Von synthetischen Oligodesoxynukleotiden (ODNs) ist

bekannt, dass neben unmethylierten CpG-Motiven v.a. Thymidin-reiche Sequenzen stark aktivierend auf Immunzellen wirken [144, 145]. Inwieweit diese Tatsache auch für die Induktion von KLF4 relevant ist, sollte ebenfalls im Rahmen zukünftiger Experimente untersucht werden (siehe Kapitel 6.4).

Wie bereits ausgeführt, scheint die Phagozytose der freien DNA für eine erfolgreiche Induktion von KLF4 nicht notwendig zu sein. Diese Beobachtung ist umso überraschender, als dass TLR9 KO BMMs sowie TRIF und MyD88 KO BMMs (Adaptermoleküle für TLR9) eine um ca. 25% reduzierte Expression von KLF4 nach Stimulation mit Pneumokokken im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen zeigten (siehe Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). TLR9 ist somit wahrscheinlich an der Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs beteiligt. TLR9 ist endolysosomal lokalisiert [40]. Wie kann es sein, dass ein endolysosomal lokalisierter PRR seinen Liganden erkennt, ohne dass dieser phagozytiert wird? Vor Beantwortung dieser Frage muss auf eine methodische Limitation hingewiesen werden. Bonder et al. konnten zeigen, dass der Einsatz von 2 μ M Cytochalasin D (wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit) die Aktinfilament-Polymerisation und somit mutmaßlich die Phagozytose nur um ca. 90% inhibiert [146]. Auch wenn im Phagozytose-Assay nach Behandlung der BMMs mit 2 μ M Cytochalasin D keine ganzen Pneumokokken mehr phagozytiert wurden (siehe Kapitel 5.1.4), ist dennoch eine Aufnahme von DNA-Molekülen durch die wahrscheinlich vorhandene phagozytäre Restkapazität nicht auszuschließen. Wird dennoch eine vollständige Blockade der Phagozytose angenommen, ist die Aktivierung von TLR9 nur durch einen alternativen Aktivierungsweg, wie beispielsweise durch Kopplung der extrazellulären DNA an HMGB1 mit anschließender Aktivierung von RAGE und subsequent von TLR9 erklärbar [57]. Der Promoter von HMGB1 enthält zwei Bindungsstellen für KLF4 [147]. Nach Stimulation mit LPS steigert KLF4 die Bildung und Freisetzung von HMGB1 in RAW264.7 Makrophagen [147]. RAGE KO BMMs exprimierten jedoch unverändert KLF4 nach Stimulation mit Pneumokokken (siehe Kapitel 5.1.8). Somit scheint HMGB1/RAGE nicht an der Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs beteiligt zu sein. Dennoch sollte im Rahmen zukünftiger Experimente auf alternative, nicht Phagozytose-abhängige Internalisierungswege von freien DNA-Molekülen fokussiert werden (siehe Kapitel 6.4).

Die Tatsache, dass TLR9 KO BMMs nur eine um ca. 25% reduzierte Expression von KLF4 nach Pneumokokkenstimulation zeigten, lässt die Beteiligung eines weiteren DNA-Rezeptors vermuten. Auch Yasuda et al. beobachteten einen ähnlichen Mechanismus. Die Bildung von TNF α durch murine Peritoneal- und RAW264.7 Makrophagen nach Stimulation mit pro- oder eukaryotischen DNA-Molekülen wird sowohl durch TLR9 als auch einen weiteren, bisher

unbekannten DNA-Rezeptor vermittelt [138]. Praktisch alle bekannten DNA-Rezeptoren sind neben MyD88 von den Adapterproteinen ASC oder STING abhängig [148]. Beide Adapterproteine scheinen jedoch nicht an der Induktion von KLF4 durch Pneumokokken beteiligt zu sein (siehe Kapitel 5.1.3 und 5.1.8). Zudem wird die Induktion offenbar nicht über Typ 1 IFNs vermittelt (siehe Kapitel 5.1.9), obwohl KLF4 durch den Interferon-regulierenden Faktor 8 (IRF8) induziert wird [149]. Für die Komponente ‚freie DNA‘ des Induktionsmechanismus kann somit angenommen werden, dass sie neben TLR9 über einen bislang unbekanntes DNA-Rezeptor oder einen von ASC, STING und Typ 1 IFNs unabhängigen Signalweg eines bekannten DNA-Rezeptors vermittelt wird.

Wird die Phagozytose-Diskussion nochmals aufgegriffen, so lässt sich vermuten, dass dieser zweite DNA-Rezeptor entweder intrazellulär lokalisiert ist und über einen nicht Phagozytose-abhängigen Internalisierungsweg von den freien DNA-Molekülen erreicht wird, oder sich auf der Oberfläche der Makrophagen befindet. Alle bisher bekannten DNA-erkennenden Rezeptoren auf der Außenseite der Plasmamembran von Makrophagen (wie der Scavenger Rezeptor A) bewirken nach Erkennung eine Internalisierung der DNA-Moleküle [150, 151]. Das Vorhandensein eines direkt immunstimulatorischen DNA-Rezeptors auf der Außenseite der Plasmamembran von Makrophagen, der sowohl pro- als auch eukaryotische DNA erkennt und permanent zugänglich ist, wäre mit der erheblichen Gefahr einer durch körpereigene DNA ausgelösten Hyperinflammation verbunden [152, 153]. Entweder ist der zweite DNA-Rezeptor also tatsächlich intrazellulär lokalisiert oder nicht permanent für seine Liganden zugänglich (siehe Kapitel 6.1.4).

Freie, körpereigene DNA ist ein DAMP, welcher von gestressten oder traumatisierten Zellen freigesetzt wird und dem Körper Gefahr signalisiert [53]. Neben freier, körpereigener DNA gibt es weitere DAMPs wie Hitzeschockproteine oder Bruchstücke von Hyaluronan [53, 54]. Liu et al. konnten zeigen, dass KLF4 bei Hitzestress (42 °C für 15 Minuten) sowohl in murinem Lungengewebe als auch in verschiedenen Zelltypen (u.a. Makrophagen) bereits nach kurzer Zeit stark induziert wird und vor allem in der Frühphase der zellulären Stressantwort eine wichtige Rolle spielt [154]. Zudem wird die Expression von KLF4 direkt vom Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (engl. „*heat shock transcription factor 1*“, Hsf1) reguliert [154], der durch erhöhte Temperaturen, Schwermetalle und bakterielle sowie virale Infektionen aktiviert wird [155]. KLF4 scheint also sowohl bei infektiösem Stress (z.B. eine Pneumokokkeninfektion) als auch bei physikalischem Stress (z.B. Hitze) in Makrophagen

induziert zu werden, was eine grundlegende Rolle von KLF4 in der zellulären Stressantwort von Makrophagen vermuten lässt.

Über die Komponente ‚freie DNA‘ des Induktionsmechanismus lässt sich daher zusammenfassend sagen, dass diese aus der Erkennung von unverdauter pro- und/oder eukaryotischer DNA (und nicht RNA) besteht. Die Erkennung erfolgt wahrscheinlich durch TLR9 sowie einen zweiten DNA-Rezeptor, der unabhängig von ASC, STING und Typ 1 IFNs ist. Dieser zweite DNA-Rezeptor ist entweder intrazellulär lokalisiert und wird Phagozytose-unabhängig von der freien DNA erreicht oder befindet sich auf der Außenseite der Plasmamembran und ist nicht permanent zugänglich. Außerdem bestätigt sich, dass KLF4 offenbar eine grundlegende Rolle in der Stressantwort von Makrophagen spielt.

6.1.4 Die mögliche Bedeutung der Zweiteiligkeit des Induktionsmechanismus

Warum braucht es sowohl die Komponente ‚Kontakt‘ als auch die Komponente ‚freie DNA‘ für eine erfolgreiche Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken? Wird für KLF4 eine *proinflammatorische* Funktion in Makrophagen bei Pneumokokkeninfektion angenommen (siehe Kapitel 6.2), könnte es sich um einen Synergismus zur Induktion einer suffizienten Immunantwort oder einen Schutzmechanismus zur Vermeidung einer inadäquaten Immunaktivierung handeln.

iNOS wird in RAW264.7 Makrophagen für eine Potenzierung der Immunantwort synergistisch durch LPS und freie, bakterielle DNA induziert [156]. Für die Bildung des proinflammatorischen Zytokins TNF α ist ein vergleichbarer Mechanismus bekannt [157]. Die Tatsache, dass KLF4 durch die beiden Komponenten des Induktionsmechanismus einzeln nicht schwächer (wie [156] und [157]), sondern gar nicht induziert wird (siehe Kapitel 5.1.7), spricht gegen einen Synergismus zur Verstärkung der Immunantwort.

Eine Aktivierung von Immunzellen wie Makrophagen führt immer auch zu Kollateralschäden an körpereigenem Gewebe und muss daher streng reguliert werden [68]. Wird für den zweiten DNA-Rezeptor der Komponente ‚freie DNA‘ tatsächlich eine Lokalisierung auf der Außenseite der Plasmamembran der Makrophagen angenommen, so könnte seine Zugänglichkeit für freie DNA-Moleküle zur Vermeidung einer inzidentellen Aktivierung beispielsweise durch freie wirtseigene DNA ohne Pneumokokkeninfektion von der Komponente ‚Kontakt‘ abhängig sein. Die Zweiteiligkeit des Induktionsmechanismus wäre dann ein Schutzmechanismus vor einer ungewollten Induktion von KLF4. Denkbar ist eine

Konformationsänderung des DNA-Rezeptors oder eine Regulation seiner Expression durch direkten Kontakt zwischen Pneumokokken und BMMs. Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) bindet beispielsweise mit seinem Oberflächenprotein gp120 an den CD4-Rezeptor seiner Zielzellen, was eine Freilegung und Konformationsänderung von gp41 bewirkt und die Fusion des Virus mit der Wirtszelle ermöglicht [158]. Direkter Kontakt von RAW264.7 Makrophagen mit *Salmonella typhimurium* führt zu einer Steigerung der Expression verschiedener Rezeptoren auf der Plasmamembran der Makrophagen [159].

Gleichzeitig verringert die Zweiteiligkeit des Induktionsmechanismus womöglich auch die Wahrscheinlichkeit einer Induktion von KLF4 durch avirulente Pneumokokken, die keine Nekrose von Wirtszellen induzieren und somit zumindest keine eukaryotische DNA freisetzen [117]. Vor der Identifikation aller am Induktionsmechanismus beteiligten Rezeptoren und Signalwege kann über die tatsächliche Bedeutung der Zweiteiligkeit jedoch nur spekuliert werden.

Zusammenfassend wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein zweiteiliger Induktionsmechanismus von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs vorgestellt. Dieser setzt sich aus der Komponente ‚Kontakt‘ und der Komponente ‚freie DNA‘ zusammen. Die Komponente ‚Kontakt‘ besteht wahrscheinlich aus der Erkennung eines PAMPs auf der Zellwand der Pneumokokken durch einen PRR auf der Außenseite der Plasmamembran der Makrophagen. Der PAMP scheint kein Peptidoglykan, kein Lipoprotein, kein Polysaccharid und keine Teichonsäure zu sein. Es könnte sich um ein zellwandständiges bakterielles Protein handeln, welches hauptsächlich während der bakteriellen Replikation exprimiert wird. Für seine Erkennung ist offenbar direkter Kontakt zwischen den Pneumokokken und den Makrophagen notwendig. Die Komponente ‚freie DNA‘ besteht aus der Erkennung unverdauter pro- und eukaryotischer DNA durch TLR9 sowie einen zweiten DNA-Rezeptor. Dieser scheint unabhängig von ASC, STING und Typ 1 IFNs zu sein. Der Rezeptor ist entweder intrazellulär lokalisiert und wird nicht Phagozytose-abhängig von der freien DNA erreicht oder er befindet sich auf der Außenseite der Plasmamembran der Makrophagen und kann seine Liganden nur bei direktem Kontakt mit Pneumokokken binden. Entweder hängt seine Zugänglichkeit für die freie DNA von einer Kontakt-vermittelten Änderung seiner Konformation ab, oder er wird erst nach Kontakt mit den Pneumokokken auf der Plasmamembran der BMMs exprimiert. Die Abbildungen 20 und 21 fassen die Signalwege und Rezeptoren zusammen, für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung am

Induktionsmechanismus von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs gezeigt (siehe Abbildung 20) bzw. ausgeschlossen (siehe Abbildung 21) werden konnte.

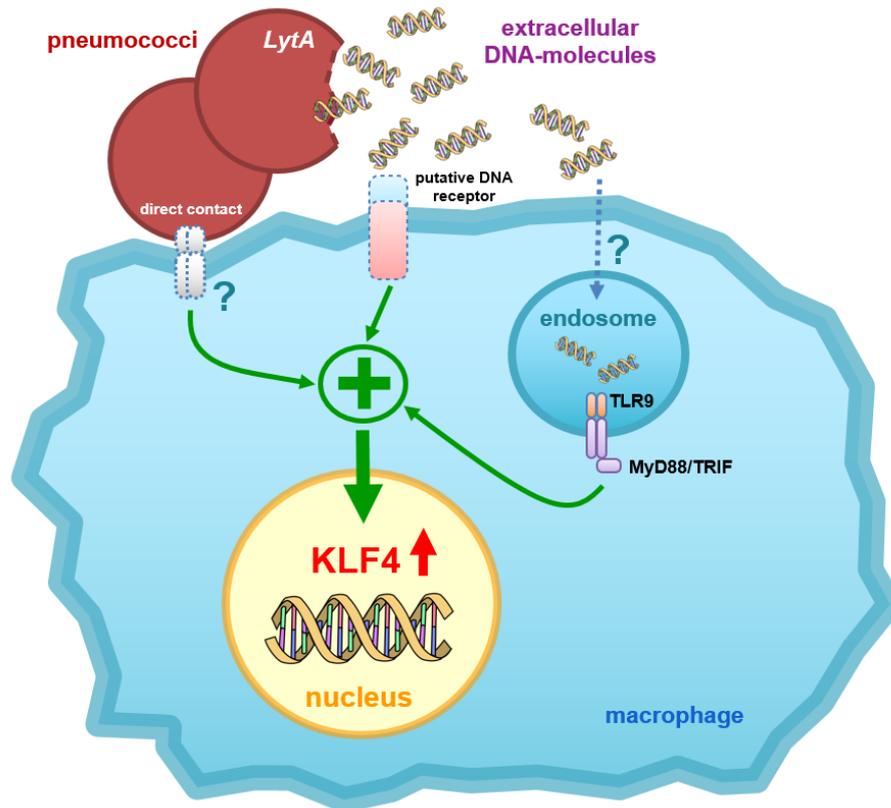


Abbildung 20: Übersicht über die am Induktionsmechanismus von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs beteiligten Rezeptoren und Signalwege

KLF4 wird durch direkten Kontakt mit replizierenden Pneumokokken in Kombination mit freier, extrazellulärer pro- und eukaryotischer DNA in BMMs induziert. Diese Induktion wird teilweise durch TLR9/MyD88/TRIF sowie einen zweiten, bisher nicht bekannten DNA-Rezeptor vermittelt.

Quelle: Herta et al. [160]

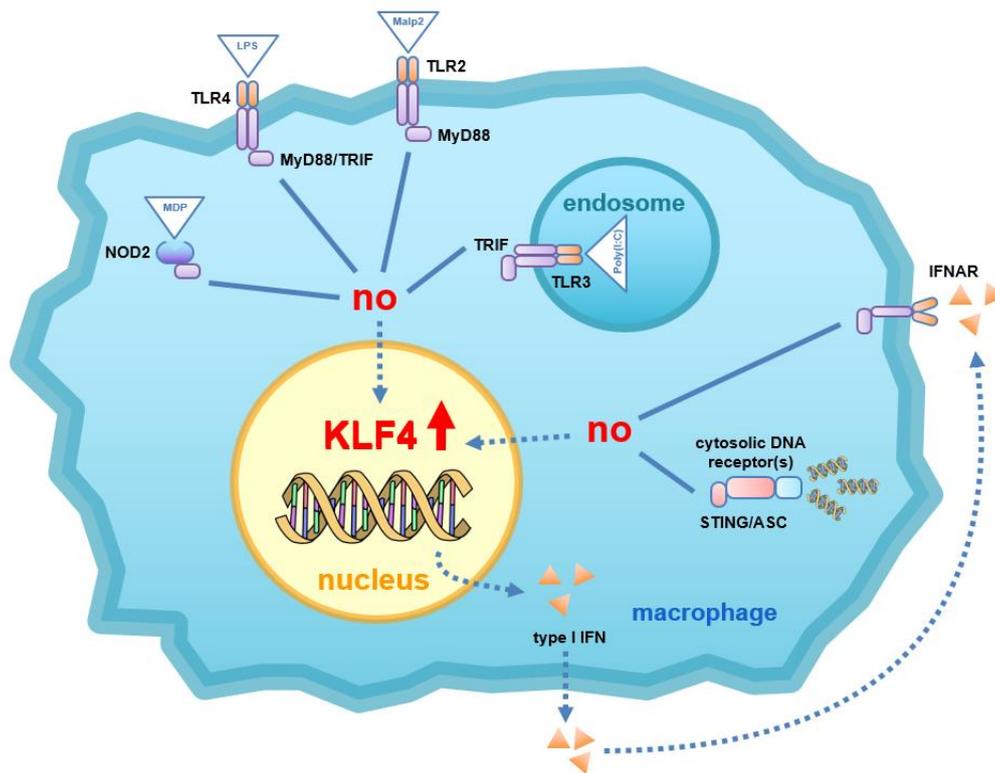


Abbildung 21: Übersicht über die nicht an der Induktion von KLF4 durch Pneumokokken in BMMs beteiligten Rezeptoren und Signalwege

Quelle: Herta et al. [160]

6.2 Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Um die Funktion von KLF4 in Makrophagen bei einer Infektion mit Pneumokokken zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit BMMs aus *in vivo* mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelten ERT-Cre^{-/-}/KLF4^{loxP/loxP} Mäusen (KLF4 WT) und ERT-Cre^{+/-}/KLF4^{loxP/loxP} Mäusen (KLF4 KD) verwendet.

6.2.1 Regulation der Zytokinbildung in BMMs bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Nach Stimulation von KLF4 WT und KLF4 KD BMMs mit Pneumokokken zeigte sich, dass der *knockdown* von KLF4 in BMMs zu einer signifikant *reduzierten* Bildung von KC (dem murinen Äquivalent zum humanen CXCR8 bzw. IL-8) und einer deutlich *gesteigerten* Bildung

von IL-10 führte (siehe Kapitel 5.2.2). Da KLF4 als Transkriptionsfaktor die Transkription seiner Zielgene abhängig vom Promoter sowohl hemmen als auch aktivieren kann [83], ist diese gegenläufige Beeinflussung der Transkription von KC und IL-10 plausibel. Für die Transkription beider Zytokine in Makrophagen ist eine Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor NF- κ B bekannt [101, 161]. Feinberg et al. konnten zeigen, dass KLF4 in RAW264.7 Makrophagen nach Stimulation mit LPS mit der NF- κ B Untereinheit p65 interagiert, was die Transkription proinflammatorischer Targets wie iNOS aktiviert [94]. Ein ähnlicher Mechanismus konnte in Mikrogliazellen, den Gewebsmakrophagen des Zentralen Nervensystems, beobachtet werden. Dort interagiert KLF4 mit NF- κ B, was zu einer gesteigerten Transkription von iNOS sowie der Cyclooxygenase 2 (Cox2) führt [162]. Cox2 steuert die Bildung proinflammatorischer Prostaglandine [163]. Es kann daher angenommen werden, dass KLF4 in BMMs nach Stimulation mit Pneumokokken mit NF- κ B interagiert und darüber die Bildung proinflammatorischer Zytokine aktiviert bzw. antiinflammatorischer Zytokine hemmt. In Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigten Kaushik et al., dass ein *knockout* von KLF4 in Mikrogliazellen die Bildung des proinflammatorischen Zytokins TNF α reduziert [162], dessen Transkription ebenfalls u.a. durch NF- κ B reguliert wird [164].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass KLF4 nach Induktion durch Pneumokokken in BMMs durch Steigerung der Bildung von KC und Hemmung von IL-10 die Ausbildung eines proinflammatorischen Makrophagenphänotyps fördert. M1 bzw. klassisch aktivierte Makrophagen sind die eigentlichen Effektorzellen der angeborenen Immunantwort. Sie phagozytieren und eliminieren opsonisierte Erreger, bilden toxische Sauerstoff- und Stickstoffradikale sowie proinflammatorische Zytokine und aktivieren das erworbene Immunsystem [46].

Feinberg et al. und Kaushik et al. stützen wie bereits ausgeführt diese Beobachtung und schreiben KLF4 ebenfalls eine proinflammatorische Funktion in J774a- und RAW264.7-Makrophagen [94] bzw. Mikrogliazellen [162] zu. Alder et al. zeigten, dass KLF4 für die Differenzierung inflammatorischer Monozyten aus hämatopoetischen Progenitorzellen essenziell ist [85]. Inflammatorische Monozyten sind eine Subpopulation der im Blut zirkulierenden Monozyten, welche durch die Expression von Chemokinrezeptoren wie CXCR2 sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle gezielt in Entzündungsherde einwandern und dort in Gewebsmakrophagen umgewandelt werden [43, 165]. Eine wesentliche Rolle bei der Monozytenrekrutierung durch Förderung der Chemotaxis u.a. durch Bindung an CXCR2 sowie Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten zur

Leukodiapedese spielt IL-8 [166-168]. Bei einer Infektion mit Pneumokokken könnte KLF4 somit die Chemotaxis von Monozyten zum Ort der Infektion auf zweierlei Weise beeinflussen: sowohl durch die Förderung der Differenzierung inflammatorischer Monozyten mit Expression von Chemokinrezeptoren wie CXCR2 (Pneumokokken-unabhängig) als auch durch die Steigerung der Bildung des Chemokins KC bzw. CXCL8/IL-8 durch Makrophagen am Ort der Infektion (Pneumokokken-abhängig). Darüber hinaus scheint KLF4 die Bildung weiterer Chemokine wie CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und CCL6 durch Monozyten und Makrophagen zu fördern [149]. Auch in embryonalen Fibroblasten wird KLF4 eine wichtige Rolle in der Regulation der Chemotaxis zugeschrieben [169].

Neben der *Förderung* der M1 Polarisierung von Makrophagen *inhibiert* KLF4 gleichzeitig eine M2 Polarisierung u.a. durch Inhibierung von Smad3, einem wichtigen Effektorprotein in der Signalkaskade von TGF β (engl. „*transforming growth factor β* “) [94]. Das immunsuppressive Zytokin TGF β wird u.a. von aktivierten Makrophagen gebildet und stimuliert in verschiedenen Zelltypen antiinflammatorische Signalwege [170]. In Makrophagen fördert TGF β die Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, was einer überschießenden Immunantwort mit Zerstörung von körpereigenem Gewebe entgegenwirkt [46]. Ein *knockdown* von KLF4 in Makrophagen führt zu einer Enthemmung der TGF β -Smad3 Signalkaskade und fördert somit die Bildung von IL-10 [94], was sich mit der von uns beobachteten gesteigerten Bildung von IL-10 durch KLF4 KD BMMs im Vergleich mit KLF4 WT BMMs bei Stimulation mit Pneumokokken deckt.

Es gibt jedoch auch gegenteilige Veröffentlichungen, die KLF4 eine *Förderung* des *antiinflammatorischen* M2 Phänotyps in Makrophagen zuschreiben. Liu et al. beobachteten, dass KLF4 nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit LPS an den IL-10 Promoter bindet und die Transkription von IL-10 steigert [95]. RAW264.7 Makrophagen gehen, wie bereits ausgeführt, auf eine murine Tumorzelllinie zurück. In verschiedenen Tumorentitäten, u.a. Pankreaskarzinom und Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, konnte eine gesteigerte Bildung von IL-10 durch Tumor-assoziierte Makrophagen u.a. nach Aktivierung von TLR4 (dem Rezeptor für LPS) mit einer Progression der Tumorerkrankung assoziiert werden [171, 172]. Tumorpatienten mit fortgeschrittener Metastasierung weisen häufig stark erhöhte IL-10 Serumspiegel auf [173]. Unter Berücksichtigung der bereits erläuterten wichtigen Rolle von KLF4 in der Entstehung maligner Tumore könnte der Unterschied in der Regulierung von IL-10 durch KLF4 durch den Einsatz einer Tumorzelllinie (RAW264.7 Makrophagen) bzw. Primärmakrophagen (in dieser Studie) erklärbar sein.

Darüber hinaus zeigten Liao et al., dass KLF4 mit STAT6 (einem Transkriptionsfaktor, der die antiinflammatorischen Effekte von IL-4 auf Makrophagen vermittelt [174]) interagiert und die Transkription von M2 Markerproteinen wie Arg-1 (Arginase 1) oder PPAR γ (engl. „*peroxisome proliferator-activated receptor γ* “) steigert [96]. PPAR γ hemmt nach Ligandenbindung die Expression proinflammatorischer M1 Gene in Makrophagen u.a. durch eine Inhibierung der transkriptionsfördernden Wirkung von NF- κ B [175]. Liao et al. beobachteten weiterhin, dass KLF4 mit NF- κ B um die Koaktivatoren p300 und CBP konkurriert und auf diese Weise die Expression proinflammatorischer Enzyme wie Cox2 und iNOS in Makrophagen hemmt [96]. Dies widerspricht sowohl unseren Experimenten (die KLF4 eine proinflammatorische Funktion in Makrophagen zuschreiben) als auch den bereits zitierten Veröffentlichungen von Kaushik et al. und Feinberg et al., die eine Interaktion von KLF4 und NF- κ B mit anschließender *Induktion* von Cox2 [162] und iNOS [94] in Makrophagen zeigten. Diese konträren Ergebnisse lassen sich nicht durch den Einsatz einer Zelllinie bzw. von Primärzellen erklären, da Liao et al. neben RAW264.7 Makrophagen auch BMMs verwendeten. Im Unterschied zu unseren Experimenten setzten Liao et al. jedoch nicht Pneumokokken für die Induktion von KLF4 ein, sondern IL-4 [96]. Denkbar ist daher, dass durch Pneumokokken, jedoch nicht durch IL-4, weitere Transkriptionsfaktoren in den BMMs induziert werden, die die Funktion von KLF4 modifizieren, beispielsweise durch direkte Protein-Protein Interaktion oder den „Verbrauch“ von Kofaktoren. So ist etwa bekannt, dass auch KLF2 an der Regulierung der inflammatorischen Eigenschaften von Makrophagen beteiligt ist [176]. KLF2 konkurriert mit NF- κ B um die Kofaktoren p300 und CBP, und inhibiert darüber die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B [176]. Pneumokokken induzieren KLF2 in pulmonalen Epithelzellen, was die Bildung von IL-8 reduziert [177]. KLF2 und KLF4 weisen eine enge strukturelle Verwandtschaft auf [178]. Daher ist denkbar, dass Pneumokokken in Makrophagen neben KLF4 auch KLF2 induzieren. Womöglich interferiert KLF2 mit der Funktion von KLF4, zum Beispiel in Hinblick auf die Regulation von M1/M2 Markerproteinen oder Zytokinen wie IL-8 oder IL-10. Die Induktion von KLF2 durch Pneumokokken in Makrophagen und der Einfluss von KLF2 auf die Funktion von KLF4 sollte Gegenstand eines separaten Forschungsprojektes sein.

Alles in allem erhärten die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Hypothese, dass KLF4 ein wichtiger Regulator des angeborenen Immunsystems bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* ist. In BMMs scheint KLF4 nach Induktion durch Pneumokokken durch eine Steigerung der Bildung von KC (dem murinen CXC8 bzw. IL-8) und einer Hemmung der Bildung von IL-10 eine proinflammatorische M1 Polarisierung zu fördern.

6.2.2 Beeinflussung der Zerstörung der BMMs durch *Streptococcus pneumoniae*

Neben der Regulation der Zytokinbildung zeigte sich, dass KLF4 auch das Ausmaß der „Zerstörung“ der BMMs durch *Streptococcus pneumoniae* zu beeinflussen scheint (siehe Kapitel 5.2.1). KLF4 KD BMMs imponierten stärker morphologisch verändert nach Stimulation mit D39 Pneumokokken (vereinzelt, abgerundet, weniger BMMs am Wellboden adhärent) als KLF4 WT BMMs, vereinbar mit einem gesteigerten Pneumokokken-induzierten Zelltod [179]. Die Frage, ob diese lichtmikroskopische Beobachtung ein Anhalt für vermehrte Pneumokokken-induzierte Apoptose, Nekrose oder das Resultat eines destabilisierten Zytoskeletts ist, lässt sich gegenwärtig nur spekulativ beantworten und bedarf weiterer Experimente (siehe Kapitel 6.4).

KLF4 spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der Apoptose [88-90]. Apoptose ist ein kontrollierter Prozess der Selbstdestruktion einer Zelle, zumeist als Reaktion auf einen externen Stimulus [43]. Eine Vielzahl von Bakterien induzieren Apoptose in Makrophagen [180]. *Streptococcus pneumoniae* reagiert auf Hitzestress (z.B. Translokation vom Nasopharynx mit einer Temperatur von ca. 30 °C in die Lunge oder das Blut mit einer Temperatur von 37 °C) mit der Ausbildung von Hitzeschockproteinen wie der Protease ClpP (engl. „*caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit*“) [181]. Nach Hitzestress wird ClpP in der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* exprimiert [182] und induziert Apoptose in Wirtszellen, u.a. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, Steigerung der Expression des proapoptotischen Proteins BAX (engl. „*Bcl-2-associated X protein*“) und Reduktion der Expression von Bcl-2 (engl. „*B-cell lymphoma 2*“), einem antiapoptotischen Faktor [181]. Von KLF4 ist bekannt, dass er durch Hemmung von p53 die Expression von BAX inhibiert und somit antiapoptotische Eigenschaften besitzt [90]. Die Stimulationsexperimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten D39 Pneumokokken exprimierten daher als Antwort auf den Hitzestress wahrscheinlich ClpP in der Zellwand. Womöglich wirkt das Vorhandensein von KLF4 einer ClpP-abhängigen Aktivierung von p53 und BAX und somit der Induktion von Apoptose durch Pneumokokken in den KLF4 WT BMMs entgegen. Das könnte eine mögliche Erklärung für die Beobachtung sein, dass KLF4 WT BMMs deutlich weniger makroskopisch „beschädigt“ imponieren als die korrespondierenden KLF4 KD BMMs. Eventuell schützt KLF4 die BMMs vor einer Pneumokokken-induzierten Apoptose. Ji et al. konnten zeigen, dass KLF4 *knockout* RAW264.7 Makrophagen im Vergleich mit Wildtyp RAW264.7 Makrophagen eine

gesteigerte Apoptoserate aufweisen [183]. Die Untersuchung wurde jedoch in unstimulierten Makrophagen und nicht bei Infektion mit Pneumokokken durchgeführt.

Eine weitere, mögliche Erklärung für die größere „Zerstörung“ von KLF4 KD BMMs durch die Pneumokokken könnte eine gesteigerte Induktion von Nekrose sein. Pneumokokken induzieren durch eine Reihe von Virulenzfaktoren Nekrose in Wirtszellen [117]. KLF4 besitzt in Makrophagen, wie bereits erörtert, wahrscheinlich eine proinflammatorische Funktion, u.a. durch die Induktion von iNOS [94, 162]. iNOS bildet zytotoxische Radikale wie NO und trägt daher maßgeblich zur Elimination von pathogenen Erregern wie Pneumokokken bei [184]. Eine verminderte Expression von iNOS durch Makrophagen führt zu einer gesteigerten Induktion von Nekrose durch Pneumokokken [185]. Womöglich führt daher eine reduzierte Expression von iNOS in KLF4 KD BMMs zu einer gesteigerten Nekrose nach Stimulation mit Pneumokokken, u.a. durch eine reduzierte Elimination der Erreger. Diese Hypothese sollte durch weitere Experimente untersucht werden (siehe Kapitel 6.4).

Eine dritte mögliche Erklärung könnte ein destabilisiertes Zytoskelett durch den KLF4 *knockdown* sein. Zu den von KLF4 regulierten Genen zählen auch solche, die für Bausteine des Zytoskeletts kodieren [169]. Neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor interagiert KLF4 in glatten Muskelzellen nach Translokation ins Zytoplasma zudem direkt mit Aktinfilamenten (dem Hauptbaustein des Zytoskeletts) und reguliert durch Protein-Protein-Interaktionen die zytoskelettale Organisation [186]. Daher wäre denkbar, dass die größere „Zerstörung“ der KLF4 KD BMMs auf einem destabilisierten Zytoskelett beruht. Da KLF4 auch in KLF4 WT BMMs erst nach Stimulation mit Pneumokokken exprimiert wird, ist im Ruhezustand vor Stimulation eine identische Morphologie der KLF4 WT und KD BMMs erklärbar. Der Einfluss von KLF4 auf die Stabilisierung des Zytoskeletts in KLF4 WT BMMs kommt möglicherweise erst nach Induktion von KLF4 durch die Pneumokokken zum Tragen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass KLF4 lichtmikroskopisch die „Zerstörung“ der BMMs durch Pneumokokken beeinflusst, wobei der Verlust von KLF4 zu einer stärkeren morphologischen Veränderung (vereinzelt, abgerundet) und Verringerung der Anzahl der am Wellboden adhärenen BMMs führt. Über die Ursache dieser Beobachtung kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur spekuliert werden.

6.2.3 Induktion von KLF4 als Vorteil für *Streptococcus pneumoniae*

Bisherige Überlegungen im Rahmen dieser Arbeit schrieben der Induktion von KLF4 in BMMs durch Pneumokokken in erster Linie eine Bedeutung für die Immunantwort zu.

Möglich wäre jedoch auch, dass die Induktion von KLF4 sich als Vorteil für *Streptococcus pneumoniae* herausstellt. Neben Oct3/4, Sox2 und c-Myc gehört KLF4 zu den vier Transkriptionsfaktoren, deren Expression ausdifferenzierte Zellen in pluripotente Stammzellen zurücktransformieren kann [91, 92]. Es ist daher denkbar, dass *Streptococcus pneumoniae* durch Induktion dieser Faktoren gezielt Makrophagen dedifferenziert, um einer Erkennung und Eliminierung zu entgehen. Inwieweit Pneumokokken auch die Expression von Oct3/4, Sox2 oder c-Myc in Makrophagen fördern, ist nicht bekannt. Die Induktion von KLF4 könnte jedoch ein Hinweis auf eine solche Strategie sein. Die Eigenschaft einiger bakterieller Erreger, Wirtszellen durch Manipulation von Signalwegen oder Veränderung der Chromatinstruktur umzuprogrammieren, ist ein bekanntes, wenn auch noch wenig untersuchtes Phänomen [187]. *Mycobacterium leprae* z.B. transformiert seine Zielzellen, die Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystems, in Progenitor-/Stammzell-ähnliche Zellen zurück, um seine Dissemination und letztlich sein Überleben im Wirt zu gewährleisten [188]. Milchsäurebakterien, Kommensale des Magen-Darm-Traktes, wandeln nach Inkorporation humane dermale Fibroblasten in multipotente Zellen um, die strukturell und behavioral embryonalen Stammzellen ähneln [189]. Die Frage, ob *Streptococcus pneumoniae* durch einen vergleichbaren Mechanismus einer Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem entgegenwirkt, sollte im Rahmen zukünftiger Projekte adressiert werden.

6.3 Schlussfolgerung

Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen, dass KLF4 ein wichtiger Regulator des angeborenen Immunsystems bei Pneumokokkenpneumonie ist. Interessanterweise lässt sich ein deutlicher Unterschied in Bezug auf den Induktionsweg und die Funktion von KLF4 in Makrophagen im Vergleich mit pulmonalen Epithelzellen bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* beobachten. Gemeinsame Voraussetzung für eine KLF4-Induktion ist für beide Zelltypen das Vorhandensein von freier DNA und somit von lebenden, autolysierenden Pneumokokken. Während im Epithel die Erkennung der bakteriellen DNA über TLR9 und MyD88 erfolgt [97], wird KLF4 in Makrophagen über einen zweiteiligen Mechanismus bestehend aus direktem Kontakt zwischen Pneumokokken und Makrophagen und freier pro- und/oder eukaryotischer DNA induziert. TLR9, MyD88 und TRIF sind an diesem Induktionsmechanismus beteiligt. In Epithelzellen steigert KLF4 bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* die Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [97] und hemmt die Sekretion von IL-8 [190]. Im Gegensatz dazu reduziert KLF4 in Makrophagen die

Ausschüttung von IL-10 und steigert die Bildung von KC (dem murinen Äquivalent des humanen IL-8). Offenbar fördert KLF4 nach Induktion durch Pneumokokken in Makrophagen die Ausbildung eines proinflammatorischen Makrophagenphänotyps und wirkt gleichzeitig nach Induktion im pulmonalen Epithel dieser proinflammatorischen Immunantwort entgegen. Dabei scheint die Induktion in Makrophagen, aufgrund der Zweiteiligkeit des Induktionsmechanismus, strenger reguliert zu sein als in pulmonalen Epithelzellen. Dies erscheint insofern schlüssig, als dass die Einleitung einer proinflammatorischen Immunantwort immer auch Schäden an körpereigenem Gewebe verursacht und daher nur bei Kontakt mit tatsächlich virulenten Pneumokokken erfolgen darf. Das Überleben eines Pneumoniepatienten hängt neben der Erregerelimination vor allem auch von der Minimierung des körpereigenen Gewebeschadens ab [97].

Andererseits birgt eine zu frühe oder zu starke Antiinflammation die Gefahr einer Erregerpersistenz und -ausbreitung [100]. Patienten, die an einer Pneumokokkenpneumonie versterben, zeigen im Vergleich zu Überlebenden signifikant höhere Serumspiegel von IL-10 [102]. Der balancierten Expression von KLF4 in verschiedenen Zelltypen könnte somit im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie eine vitale Bedeutung zukommen. Einschränkend muss gesagt werden, dass die vorliegenden Ergebnisse auf *in vitro* Experimenten in Zelltypen aus verschiedenen Spezies (humane Epithelzellen [97, 190] bzw. murine Makrophagen) beruhen. Schlussfolgerungen können also nur unter Vorbehalt gezogen werden. Dennoch unterstreichen die Ergebnisse die auch von Kaushik et al. beschriebene gegensätzliche Funktion von KLF4 im Entzündungsgeschehen abhängig vom exprimierenden Zelltyp [162]. Gerade in Bezug auf die Pneumokokkenpneumonie scheint KLF4 somit ein hochinteressantes Zielprotein für weitere Experimente zu sein (siehe Kapitel 6.4).

6.4 Ausblick

Auf der Identifizierung aller beteiligten Rezeptoren und Signalwege des Induktionsmechanismus von KLF4 in BMMs durch *Streptococcus pneumoniae* sollte ein Schwerpunkt für die weitere Arbeit an diesem Projekt liegen. Die Erkennung freier pro- und/oder eukaryotischer DNA-Moleküle durch TLR9 im Zusammenspiel mit einem bisher nicht identifizierten (ASC, STING und Typ 1 IFN unabhängigen) zweiten DNA-Rezeptor stellt, wie bereits ausgeführt, eine Teilkomponente dieses Induktionsmechanismus dar. Eine hochauflösende, videomikroskopische Darstellung der Stimulation von BMMs mit LytA-defizienten Pneumokokken und (fluoreszenz-)markierten DNA-Molekülen könnte eine

eventuelle Aufnahme der DNA-Moleküle in das Zellinnere oder eine Ansammlung auf der Außenseite der Plasmamembran der BMMs visualisieren. Dies würde einen Rückschluss auf die Lokalisation des zweiten DNA-Rezeptors zulassen und wäre ein guter Ausgangspunkt für weitere Überlegungen. Da der endolysosomal lokalisierte TLR9 zumindest teilweise involviert zu sein scheint, die Induktion von KLF4 jedoch Phagozytose-unabhängig erfolgt, sollten Phagozytose-unabhängige (sowie nicht von HMGB1/RAGE-abhängige) Aktivierungswege für TLR9 untersucht werden. Das humane antimikrobielle Peptid LL37 aus der Gruppe der Cathelicidine spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort der Lunge und wird u.a. von Makrophagen synthetisiert [191]. LL37 bindet wie sein murines Homolog CRAMP (engl. „*cathelicidin-related antimicrobial peptide*“) extrazelluläre DNA-Moleküle und transportiert diese Phagozytose-unabhängig in das Zellinnere [192], was u.a. TLR9 aktiviert [57]. Eine Stimulation von BMMs aus Cathelicidin *knockout* Mäusen mit Pneumokokken könnte eine eventuelle Beteiligung von LL37/CRAMP an der Induktion von KLF4 nachweisen. Die Expression von KLF4 sollte (wie für alle in diesem Kapitel vorgeschlagenen Stimulationsexperimente) mittels Western Blot dargestellt werden.

Interessant für das Verständnis des DNA-Erkennungssystems wäre zudem eine Untersuchung der für eine erfolgreiche Induktion von KLF4 notwendigen Beschaffenheit der freien DNA-Moleküle. Eine Stimulation von BMMs mit LytA-defizienten Pneumokokken in Kombination mit erhitzten (einzelnsträngigen) DNA-Molekülen, Oligodesoxynukleotiden (ODNs) mit variabler Moleküllänge oder Thymidin-reichen bzw. Thymidin-armen ODNs würde eine Eingrenzung der strukturellen Voraussetzungen erlauben. Ein Abgleich der Bindungspräferenzen bekannter DNA-Rezeptoren mit den Versuchsergebnissen könnte einen Hinweis zur Identifizierung des zweiten DNA-Rezeptors liefern.

Neben freier DNA scheint die Erkennung eines PAMP von *Streptococcus pneumoniae* durch einen PRR auf der Außenseite der Plasmamembran der Makrophagen notwendig zu sein. Neben den bereits ausgeschlossenen Ligand-Rezeptorpaaren (siehe Kapitel 6.1.2) gibt es sowohl auf Seiten der Makrophagen als auch der Pneumokokken einige weitere interessante Zielmoleküle. Für den transmembranösen Rezeptor Dectin-2 auf der Plasmamembran von Makrophagen konnte eine Beteiligung an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* nachgewiesen werden [193]. Obwohl bekapselte Pneumokokken KLF4 weniger stark induzieren als unbekapselte und Dectin-2 vorrangig Kapselbestandteile erkennt [193], sollte geprüft werden, ob Dectin-2 an der Induktion von KLF4 in BMMs beteiligt ist, beispielsweise durch Stimulation von BMMs aus Dectin-2 *knockout* Mäusen mit Pneumokokken.

Auch eine Beteiligung von Galectin-3 an der Pneumokokken-abhängigen Induktion von KLF4 in BMMs sollte ausgeschlossen werden. Das Lektin Galectin-3 wird nach Kontakt mit Pneumokokken von Alveolarmakrophagen ausgeschüttet, vernetzt bakterielle und monozytäre Oberflächenstrukturen und aktiviert verschiedene Signalkaskaden, die für die angeborene Immunantwort gegen *Streptococcus pneumoniae* bedeutsam sind [194]. Galectin-3 *knockout* Mäuse entwickeln deutlich schwerere und häufiger bakteriämisch verlaufende Pneumokokkenpneumonien mit größerem pulmonalen Gewebeschaden als entsprechende Wildtyp Mäuse [195]. Eine Mitwirkung von Galectin-3 an der Induktion von KLF4 könnte durch Stimulation von BMMs aus Galectin-3 *knockout* Mäusen mit Pneumokokken untersucht werden.

Auf Seiten der Pneumokokken sollte zunächst auf PspA aus der Familie der Cholin-bindenden Proteine (Cbp) fokussiert werden. PspA ist in der Zellwand der Pneumokokken verankert und überragt die bakterielle Kapsel mit seinem N-terminalen Pol [22]. Über NF- κ B und MAPKs aktiviert es in Monozyten immunwirksame Signalwege [122]. Eine Stimulation von BMMs mit Pneumokokken nach Inaktivierung des PspA Gens [196] könnte eine eventuelle Beteiligung von PspA an der KLF4-Induktion nachweisen.

Da neben PspA auch weitere Cbps wie CbpE als mögliche PAMPs in Betracht kommen (siehe Kapitel 6.1.2), wäre zudem eine Stimulation von BMMs mit Pneumokokken nach Kultivierung der Erreger in Ethanolamin-haltigem und Cholin-freiem Medium interessant. Die Kultivierung in diesem Medium verhindert eine Verankerung von Cbps in der Zellwand der Pneumokokken [197].

Neben dem Induktionsmechanismus sollte die Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* weiterführend untersucht werden. Die gewonnenen Zytokinergebnisse könnten durch einen Bindungsnachweis von KLF4 an den IL-10 bzw. KC/IL-8 Promoter in BMMs nach Pneumokokkenstimulation mittels Chromatin-Immunopräzipitation untermauert werden. Zudem sollte die Relevanz der *in vitro* Ergebnisse durch *in vivo* Infektionsversuche getestet werden. Da KLF4 *knockout* Mäuse innerhalb kurzer Zeit nach der Geburt versterben [84] und auch postnatal induzierbare, systemische KLF4 *knockout* Tiere einen starken Phänotyp ausbilden (verminderte glattmuskuläre Zelldifferenzierung und verstärkte Gefäßfragilität [198]), sind diese für *in vivo* Infektionsversuche ungeeignet. Aus diesem Grund ist der Einsatz einer spezifischen KLF4 *knockout* Maus für myeloide Zellen (B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)}*lfo*/J) bzw. Lungenepithelzellen (CRE-C57BL/6J-Tg^(Nkx2-1-cre)2Sand/J) anzuraten, um die Funktion von KLF4 in Monozyten/

Makrophagen bzw. pulmonalen Epithelzellen in der Pneumokokkenpneumonie *in vivo* zu untersuchen. Nach oraler Infektion der WT, myeloiden KLF4 KO und epithelialen KLF4 KO Mäuse mit Pneumokokken sollten der Verlauf des Gewichts sowie die Sterblichkeit der Tiere als mögliche Parameter für das Outcome der Infektion verglichen werden. Zudem sollte zu verschiedenen Zeitpunkten eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt werden, um die Bildung der Zytokine IL-10 und KC/IL-8 in der Lunge mittels ELISA aus den BAL-Proben zu messen.

Auch *in vitro* sind weiterführende Experimente zur Untersuchung der Funktion von KLF4 in Makrophagen bei Pneumokokkeninfektion vorgesehen. Alder et al. und Feinberg et al. schreiben KLF4 einen Einfluss auf die Differenzierung von Makrophagen in proinflammatorische M1 bzw. antiinflammatorische M2 Makrophagenphänotypen zu [85, 94]. Die gewonnenen Zytokinerggebnisse lassen vermuten, dass KLF4 in BMMs bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* wahrscheinlich eine Differenzierung in M1 Makrophagen fördert. Dies könnte durch eine vergleichende Untersuchung der Expression von M1 (wie iNOS) bzw. M2 (wie Arginase-1) Differenzierungsmarkern durch WT bzw. KLF4 KD BMMs nach Pneumokokkenstimulation untermauert werden (beispielsweise auf Proteinebene mittels Western Blot). Ergänzend ist eine Untersuchung der Bedeutung von KLF4 für die Phagozytosefähigkeit der BMMs zu erwägen, beispielsweise mittels Phagozytose-Assay (siehe Kapitel 4.2.2.4) unter Einsatz von WT und KLF4 KD BMMs.

Zudem sollte der lichtmikroskopisch beobachtete Einfluss von KLF4 auf die Pneumokokken-abhängige „Zerstörung“ der BMMs genauer untersucht werden. Die Frage, ob dieser Beobachtung ein gesteigerter Zelltod oder eine Destabilisierung des Zytoskeletts von noch lebendigen BMMs zugrunde liegt, ließe sich mit einer Trypanblau-Ausschluss-Färbung der BMMs nach Pneumokokkenstimulation zum Nachweis der Zelllebensfähigkeit klären [199]. Zur Unterscheidung zwischen gesteigerter Apoptose oder Nekrose der WT bzw. KLF4 KD BMMs nach Pneumokokkenstimulation könnte die Bindung von Annexin V sowie der Uptake von Propidiumiodid mittels Durchflusszytometrie (FACS) quantifiziert werden [200].

Ein weiterer Schritt in diesem Projekt ist die Übertragung der murinen *in vitro* Ergebnisse auf humane Zellsysteme. Die Experimente zur Untersuchung des Induktionsmechanismus sowie der Funktion von KLF4 bei Stimulation mit Pneumokokken sollten in humanen Primärmakrophagen aus dem Buffy-Coat oder aus BAL-Proben wiederholt werden.

Insgesamt bleibt zu hoffen, dass die Entschlüsselung des Induktionsmechanismus und ein tieferes Verständnis der zellspezifischen Funktion von KLF4 in der Pneumokokkenpneumonie zur Entwicklung neuer Interventionsmöglichkeiten beitragen kann, die derzeitige Therapiemöglichkeiten sinnvoll ergänzen und erweitern.

7. Literaturverzeichnis

1. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education, 2015. 19th edition.
2. Mizgerd JP. *Acute lower respiratory tract infection*. N Engl J Med, 2008. **358**(7): p. 716-27.
3. Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. *Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution*. Chest, 2012. **142**(2): p. 482-491.
4. Bartlett JG, Mundy LM. *Community-acquired pneumonia*. N Engl J Med, 1995. **333**(24): p. 1618-24.
5. Pletz MW, von Baum H, van der Linden M, Rohde G, Schütte H, Suttorp N, Welte T. *The burden of pneumococcal pneumonia - experience of the German competence network CAPNETZ*. Pneumologie, 2012. **66**(8): p. 470-5.
6. Austrian R, Gold J. *Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia*. Ann Intern Med, 1964. **60**: p. 759-76.
7. Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen. *Qualitätsreport 2012*. Available from: <http://www.sqg.de/sqg/upload/CONTENT/Qualitaetsberichte/2012/AQUA-Qualitaetsreport-2012.pdf>.
8. Park DR. *The microbiology of ventilator-associated pneumonia*. Respir Care, 2005. **50**(6): p. 742-63; discussion 763-5.
9. Grossman RF, Rotschafer JC, Tan JS. *Antimicrobial treatment of lower respiratory tract infections in the hospital setting*. Am J Med, 2005. **118 Suppl 7A**: p. 29s-38s.
10. Obaro S, Adegbola R. *The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines*. J Med Microbiol, 2002. **51**(2): p. 98-104.
11. Buttery J, Moxon ER. *Capsulate bacteria and the lung*. Br Med Bull, 2002. **61**: p. 63-80.
12. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, Coley CM, Marrie TJ, Kapoor WN. *A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia*. N Engl J Med, 1997. **336**(4): p. 243-50.
13. Catterall JR. *Streptococcus pneumoniae*. Thorax, 1999. **54**(10): p. 929-37.
14. van der Poll T, Opal SM. *Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia*. Lancet, 2009. **374**(9700): p. 1543-56.

15. AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 591-603.
16. Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gatermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, de Roux A, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T. *Management of Adult Community-acquired Pneumonia and Prevention - Update 2016*. Pneumologie, 2016. **70**(3): p. 151-200.
17. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T, CAPNETZ Study Group. *CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia*. J Intern Med, 2006. **260**(1): p. 93-101.
18. Yu VL, Chiou CC, Feldman C, Ortgvist A, Rello J, Morris AJ, Baddour LM, Luna CM, Snyderman DR, Ip M, Ko WC, Chedid MB, Andremont A, Klugman KP, International Pneumococcal Study Group. *An international prospective study of pneumococcal bacteremia: correlation with in vitro resistance, antibiotics administered, and clinical outcome*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(2): p. 230-7.
19. Reinert RR. *The antimicrobial resistance profile of Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15 Suppl 3**: p. 7-11.
20. Huss A, Scott P, Stuck AE, Trotter C, Egger M. *Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis*. CMAJ, 2009. **180**(1): p. 48-58.
21. Pavia M, Bianco A, Nobile CG, Marinelli P, Angelillo IF. *Efficacy of pneumococcal vaccination in children younger than 24 months: a meta-analysis*. Pediatrics, 2009. **123**(6): p. e1103-10.
22. Jedrzejewski MJ. *Pneumococcal virulence factors: structure and function*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 187-207.
23. Robert Koch Institut. *Streptococcus pneumoniae; Raster-Elektronenmikroskopie; Maßstab = 500 nm*. 2012. Available from: http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Streptokokken/EM_Leo_56-03-1a_StreptococcusPneumoniae_JPG.jpg?__blob=publicationFile&v=4.
24. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. *The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(4): p. 288-301.
25. Martin M, Turco JH, Zegans ME, Facklam RR, Sodha S, Elliot JA, Pryor JH, Beall B, Erdman DD, Baumgartner YY, Sanchez PA, Schwartzman JD, Montero J, Schuchat A, Whitney CG. *An outbreak of conjunctivitis due to atypical Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1112-21.

26. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. *Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4653-67.
27. Hollingshead SK, Briles DE. *Streptococcus pneumoniae: new tools for an old pathogen*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(1): p. 71-7.
28. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. *Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4720-4.
29. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. *SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component*. Mol Microbiol, 1997. **25**(6): p. 1113-24.
30. Lopez R, Garcia E. *Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(5): p. 553-80.
31. Kausmally L, Johnsberg O, Lunde M, Knutsen E, Håvarstein LS. *Choline-binding protein D (CbpD) in Streptococcus pneumoniae is essential for competence-induced cell lysis*. J Bacteriol, 2005. **187**(13): p. 4338-45.
32. Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Rönnlund D, Blom H, Widengren J, Normark S, Henriques-Normark B. *LytA, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 11018-29.
33. García P, Paz González M, García E, García JL, López R. *The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of Streptococcus pneumoniae reveals evolutionary mobile domains*. Mol Microbiol, 1999. **33**(1): p. 128-38.
34. Hermoso JA, Lagartera L, González A, Stelter M, García P, Martínez-Ripoll M, García JL, Menéndez M. *Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(6): p. 533-8.
35. Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C, Andrew PW. *The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 195-201.
36. Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, Cole PJ, Wilson R. *The effect of Streptococcus pneumoniae pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro*. Microb Pathog, 1990. **9**(4): p. 275-84.
37. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. *Phylogenetic perspectives in innate immunity*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1313-8.

38. Chaplin DD. *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
39. Medzhitov R. *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
40. Takeuchi O, Akira S. *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
41. Janeway CA Jr, Medzhitov R. *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
42. Palm NW, Medzhitov R. *Not so fast: adaptive suppression of innate immunity*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1142-4.
43. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, 2017. 7th edition.
44. Tosi MF. *Innate immune responses to infection*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(2): p. 241-9.
45. Gabay C, Kushner I. *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
46. Mosser DM, Edwards JP. *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
47. Szekanecz Z, Koch AE. *Macrophages and their products in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(3): p. 289-95.
48. Zhang X, Mosser DM. *Macrophage activation by endogenous danger signals*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 161-78.
49. Sternberg EM. *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 318-28.
50. Medzhitov R. *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
51. Sharma S, Fitzgerald KA. *Innate immune sensing of DNA*. PLoS Pathog, 2011. **7**(4): p. e1001310.
52. Janeway CA Jr. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
53. Matzinger P. *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
54. Gallucci S, Matzinger P. *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 114-9.

55. Sander LE, Davis MJ, Boekschoten MV, Amsen D, Dascher CC, Ryffel B, Swanson JA, Müller M, Blander JM. *Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 385-9.
56. Kumar H, Kawai T, Akira S. *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
57. Kawai T, Akira S. *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
58. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 19-25.
59. Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, Arts P, Garritsen A, van Eenennaam H, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, van der Meer JW, Netea MG, Joosten LA. *Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(42): p. E4478-84.
60. Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S. *Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to Toxoplasma gondii*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 119-30.
61. Signorino G, Mohammadi N, Patanè F, Buscetta M, Venza M, Vanza I, Mancuso G, Midiri A, Alexopoulou L, Teti G, Biondo C, Beninati C. *Role of Toll-like receptor 13 in innate immune recognition of group B streptococci*. Infect Immun, 2014. **82**(12): p. 5013-22.
62. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
63. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H. *The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 315-23.
64. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. *Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 487-96.
65. Volpi C, Fallarino F, Pallotta MT, Bianchi R, Vacca C, Belladonna ML, Orabona C, De Luca A, Boon L, Romani L, Grohmann U, Puccetti P. *High doses of CpG*

- oligodeoxynucleotides stimulate a tolerogenic TLR9-TRIF pathway.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 1852.
66. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. *Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 975-9.
67. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G. *NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease.* Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 365-98.
68. Palm NW, Medzhitov R. *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity.* Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
69. Witznath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. *The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia.* J Immunol, 2011. **187**(1): p. 434-40.
70. Pisetsky DS. *The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP.* Clin Immunol, 2012. **144**(1): p. 32-40.
71. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. *The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells.* Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 959-65.
72. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
73. Paterson GK, Mitchell TJ. *Innate immunity and the pneumococcus.* Microbiology, 2006. **152**(Pt 2): p. 285-93.
74. Schröder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. *Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved.* J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15587-94.
75. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. *Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1966-71.

76. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
77. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. *Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system*. Cell Microbiol, 2012. **14**(4): p. 460-6.
78. Parker D, Martin FJ, Soong G, Harfenist BS, Aguilar JL, Ratner AJ, Fitzgerald KA, Schindler C, Prince A. *Streptococcus pneumoniae DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract*. MBio, 2011. **2**(3): p. e00016-11.
79. Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, Kobzik L. *The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 267-72.
80. McConnell BB, Yang VW. *Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1337-81.
81. Schuh R, Aicher W, Gaul U, Côté S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schröder C, Kemler R. *A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene*. Cell, 1986. **47**(6): p. 1025-32.
82. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. *Sp1- and Kruppel-like transcription factors*. Genome Biol, 2003. **4**(2): p. 206.
83. Vangapandu H, Ai W. *Kruppel like factor 4 (KLF4): A transcription factor with diverse context-dependent functions*. Gene Ther Mol Biol, 2009. **13**(1): p. 194-204.
84. Segre JA, Bauer C, Fuchs E. *Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 356-60.
85. Alder JK, Georgantas RW 3rd, Hildreth RL, Kaplan IM, Morisot S, Yu X, McDevitt M, Civin CI. *Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5645-52.
86. Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW. *The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18391-8.
87. Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. *Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(15): p. 2969-76.

88. Chen X, Johns DC, Geiman DE, Marban E, Dang DT, Hamlin G, Sun R, Yang VW. *Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle.* J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30423-8.
89. McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. *The diverse functions of Kruppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology.* Bioessays, 2007. **29**(6): p. 549-57.
90. Ghaleb AM, Katz JP, Kaestner KH, Du JX, Yang VW. *Kruppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage.* Oncogene, 2007. **26**(16): p. 2365-73.
91. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.* Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
92. Takahashi K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
93. Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, Hirai H, Katz JP, Haspel RL, Gray S, Akashi K, Segre J, Kaestner KH, Tenen DG, Jain MK. *The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation.* Embo j, 2007. **26**(18): p. 4138-48.
94. Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, Lebedeva MA, Senbanerjee S, Jain MK. *Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages.* J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38247-58.
95. Liu J, Zhang H, Liu Y, Wang K, Feng Y, Liu M, Xiao X. *KLF4 regulates the expression of interleukin-10 in RAW264.7 macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(3): p. 575-81.
96. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N, Flask CA, Kim J, Doreian BW, Lu KQ, Kaestner KH, Hamik A, Clément K, Jain MK. *Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization.* J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2736-49.
97. Zahlten J, Steinicke R, Bertrams W, Hocke AC, Scharf S, Schmeck B, Witzentrath M, Hammerschmidt S, Suttorp N, Hippenstiel S. *TLR9- and Src-dependent expression of Krueppel-like factor 4 controls interleukin-10 expression in pneumonia.* Eur Respir J, 2013. **41**(2): p. 384-91.
98. Borish LC, Steinke JW. 2. *Cytokines and chemokines.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S460-75.

99. Horn F. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Thieme Verlag, 2012. 5th edition.
100. Mege JL, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D. *The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(9): p. 557-69.
101. Saraiva M, O'Garra A. *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
102. Lee YL, Chen W, Chen LY, Chen CH, Lin YC, Liang SJ, Shih CM. *Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia*. J Crit Care, 2010. **25**(1): p. 176.e7-13.
103. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 513-45.
104. Anderson P. *Post-transcriptional control of cytokine production*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 353-9.
105. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. *The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases*. Expert Rev Clin Immunol, 2014. **10**(5): p. 593-619.
106. Marriott HM, Gascoyne KA, Gowda R, Geary I, Nicklin MJ, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Whyte MK, Sabroe I, Dockrell DH. *Interleukin-1beta regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to Streptococcus pneumoniae, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 1140-9.
107. Schmeck B, Moog K, Zahlten J, van Laak V, N'Guessan PD, Opitz B, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells*. Respir Res, 2006. **7**: p. 98.
108. Martin TR, Frevert CW. *Innate immunity in the lungs*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(5): p. 403-11.
109. Shoji K, Ohashi K, Sampei K, Oikawa M, Mizuno K. *Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **424**(1): p. 52-7.
110. Abram CL, Lowell CA. *The diverse functions of Src family kinases in macrophages*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4426-50.
111. Sanjuan MA, Rao N, Lai KT, Gu Y, Sun S, Fuchs A, Fung-Leung WP, Colonna M, Karlsson L. *CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent*

- mechanism and is required for cytokine secretion.* J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 1057-68.
112. Taylor PR, Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Gordon S. *The role of SIGNRI and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages.* J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1157-62.
113. Schroder K, Tschopp J. *The inflammasomes.* Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
114. Paludan SR, Bowie AG. *Immune sensing of DNA.* Immunity, 2013. **38**(5): p. 870-80.
115. Nicod LP. *Lung defences: an overview.* European Respiratory Review, 2005. **14**(95): p. 45-50.
116. Martner A, Skovbjerg S, Paton JC, Wold AE. *Streptococcus pneumoniae autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines.* Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3826-37.
117. Zysk G, Bejo L, Schneider-Wald BK, Nau R, Heinz H. *Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by Streptococcus pneumoniae.* Clin Exp Immunol, 2000. **122**(1): p. 61-6.
118. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.* Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1659-65.
119. Moscoso M, Claverys JP. *Release of DNA into the medium by competent Streptococcus pneumoniae: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA.* Mol Microbiol, 2004. **54**(3): p. 783-94.
120. Hervé-Grépinet V, Veillard F, Godat E, Heuzé-Vourc'h N, Lecaille F, Lalmanach G. *Extracellular catalase activity protects cysteine cathepsins from inactivation by hydrogen peroxide.* FEBS Lett, 2008. **582**(9): p. 1307-12.
121. Vadesilho CF, Ferreira DM, Moreno AT, Chavez-Olortegui C, Machado de Avilla RA, Oliveira ML, Ho PL, Miyaji EN. *Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with Streptococcus pneumoniae.* Microb Pathog, 2012. **53**(5-6): p. 243-9.
122. Cao J, Chen T, Gong Y, Ying B, Li D, Xu W, Zhang X, Wang L, Yin Y. *Molecular mechanisms of the secretion of cytokines and chemokines from human monocytes activated by pneumococcal surface protein A (PspA): Roles of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB.* Microb Pathog, 2010. **48**(6): p. 220-9.

123. Weiser JN. *Phase variation in colony opacity by Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist, 1998. **4**(2): p. 129-35.
124. Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, Opitz B, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Kracht M, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(4): p. L730-1737.
125. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. *Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS*. Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 903-14.
126. Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY. *Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41613-23.
127. Kang YS, Kim JY, Bruening SA, Pack M, Charalambous A, Pritsker A, Moran TM, Loeffler JM, Steinman RM, Park CG. *The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae in the marginal zone of mouse spleen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 215-20.
128. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. *Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 873-84.
129. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. *Role of novel choline binding proteins in virulence of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5690-5.
130. Stacey KJ, Young GR, Clark F, Sester DP, Roberts TL, Naik S, Sweet MJ, Hume DA. *The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3614-20.
131. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 546-9.
132. Stunz LL, Lenert P, Peckham D, Yi AK, Haxhinasto S, Chang M, Krieg AM, Ashman RF. *Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(5): p. 1212-22.
133. Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H, Wagner H. *Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6129-36.

134. Ghaleb AM, Laroui H, Merlin D, Yang VW. *Genetic deletion of Klf4 in the mouse intestinal epithelium ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by modulating the NF-kappaB pathway inflammatory response*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(5): p. 811-20.
135. Suzuki K, Mori A, Ishii KJ, Saito J, Singer DS, Klinman DM, Krause PR, Kohn LD. *Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2285-90.
136. Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, Kohn LD, Klinman DM. *Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs*. *J Immunol*, 2001. **167**(5): p. 2602-7.
137. Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S. *Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation*. *J Exp Med*, 2005. **202**(10): p. 1333-9.
138. Yasuda K, Ogawa Y, Yamane I, Nishikawa M, Takakura Y. *Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways*. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(1): p. 71-9.
139. Kawane K, Fukuyama H, Yoshida H, Nagase H, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Okada K, Iida T, Nagata S. *Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(2): p. 138-44.
140. Yasuda K, Ogawa Y, Kishimoto M, Takagi T, Hashida M, Takakura Y. *Plasmid DNA activates murine macrophages to induce inflammatory cytokines in a CpG motif-independent manner by complex formation with cationic liposomes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **293**(1): p. 344-8.
141. Roberts TL, Dunn JA, Terry TD, Jennings MP, Hume DA, Sweet MJ, Stacey KJ. *Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides*. *J Immunol*, 2005. **175**(6): p. 3569-76.
142. Wu CC, Lee J, Raz E, Corr M, Carson DA. *Necessity of oligonucleotide aggregation for toll-like receptor 9 activation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33071-8.
143. Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, Ludwig H, Sutter G, Suzuki K, Hemmi H, Sato S, Yamamoto M, Uematsu S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(1): p. 40-8.
144. Elias F, Flo J, Lopez RA, Zorzopulos J, Montaner A, Rodriguez JM. *Strong cytosine-guanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic*

- oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT motifs.* J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3697-704.
145. Vollmer J, Janosch A, Laucht M, Ballas ZK, Schetter C, Krieg AM. *Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes.* Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002. **12**(3): p. 165-75.
146. Bonder EM, Mooseker MS. *Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament.* J Cell Biol, 1986. **102**(1): p. 282-8.
147. Liu J, Liu Y, Zhang H, Chen G, Wang K, Xiao X. *KLF4 promotes the expression, translocation, and release of HMGB1 in RAW264.7 macrophages in response to LPS.* Shock, 2008. **30**(3): p. 260-6.
148. Gurtler C, Bowie AG. *Innate immune detection of microbial nucleic acids.* Trends Microbiol, 2013. **21**(8): p. 413-20.
149. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. *Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation.* Blood, 2013. **121**(10): p. 1839-49.
150. Chen X, Kube DM, Cooper MJ, Davis PB. *Cell surface nucleolin serves as receptor for DNA nanoparticles composed of pegylated polylysine and DNA.* Mol Ther, 2008. **16**(2): p. 333-42.
151. Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS. *The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides.* Immunology, 2001. **103**(2): p. 226-34.
152. Powell K. *Toll-free autoimmunity.* The Journal of Experimental Medicine, 2005. **202**(10): p. 1305-1305.
153. Atianand MK, Fitzgerald KA. *Molecular Basis of DNA Recognition in the Immune System.* The Journal of Immunology, 2013. **190**(5): p. 1911-1918.
154. Liu Y, Wang J, Yi Y, Zhang H, Liu J, Liu M, Yuan C, Tang D, Benjamin IJ, Xiao X. *Induction of KLF4 in response to heat stress.* Cell Stress Chaperones, 2006. **11**(4): p. 379-89.
155. Liu Y, Liu M, Liu J, Zhang H, Tu Z, Xiao X. *KLF4 is a novel regulator of the constitutively expressed HSP90.* Cell Stress Chaperones, 2010. **15**(2): p. 211-7.
156. Gao JJ, Zuvanich EG, Xue Q, Horn DL, Silverstein R, Morrison DC. *Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages.* J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4095-9.

157. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Häcker H, Heeg K, Wagner H. *Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1671-9.
158. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R. *The HIV Env-mediated fusion reaction*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1614**(1): p. 36-50.
159. Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock RE, Finlay BB. *Salmonella typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5894-904.
160. Herta T, Bhattacharyya A, Bollensdorf C, Kabus C, García P, Suttorp N, Hippenstiel S, Zahlten J. *DNA-release by Streptococcus pneumoniae autolysin LytA induced Krueppel-like factor 4 expression in macrophages*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5723.
161. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. *Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10193-7.
162. Kaushik DK, Gupta M, Das S, Basu A. *Kruppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 68.
163. Fitzpatrick FA. *Cyclooxygenase enzymes: regulation and function*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(6): p. 577-88.
164. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. *TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4277-85.
165. Gordon S, Taylor PR. *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
166. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
167. Baggiolini M, Clark-Lewis I. *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
168. Shi C, Pamer EG. *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.

169. Hagos EG, Ghaleb AM, Kumar A, Neish AS, Yang VW. *Expression profiling and pathway analysis of Kruppel-like factor 4 in mouse embryonic fibroblasts*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(1): p. 85-97.
170. Chaudhury A, Howe PH. *The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigne enigma*. IUBMB Life, 2009. **61**(10): p. 929-39.
171. Liu CY, Xu JY, Shi XY, Huang W, Ruan TY, Xie P, Ding JL. *M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway*. Lab Invest, 2013. **93**(7): p. 844-54.
172. Wang R, Lu M, Zhang J, Chen S, Luo X, Qin Y, Chen H. *Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 62.
173. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. *Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy*. Immunol Res, 2011. **51**(2-3): p. 170-82.
174. Ohmori Y, Hamilton TA. *STAT6 is required for the anti-inflammatory activity of interleukin-4 in mouse peritoneal macrophages*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 29202-9.
175. Straus DS, Glass CK. *Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms*. Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 551-8.
176. Das H, Kumar A, Lin Z, Patino WD, Hwang PM, Feinberg MW, Majumder PK, Jain MK. *Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6653-8.
177. Zahlten J, Steinicke R, Opitz B, Eitel J, N'guessan PD, Vinzing M, Witzenrath M, Schmeck B, Hammerschmidt S, Suttorp N, Hippenstiel S. *TLR2- and nucleotide-binding oligomerization domain 2-dependent Kruppel-like factor 2 expression downregulates NF-kappa B-related gene expression*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 597-604.
178. Bieker JJ. *Kruppel-like factors: three fingers in many pies*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34355-8.
179. Haim YO, Unger ND, Souroujon MC, Mittelman M, Neumann D. *Resistance of LPS-activated bone marrow derived macrophages to apoptosis mediated by dexamethasone*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4323.

180. Zychlinsky A, Sansonetti P. *Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis*. J Clin Invest, 1997. **100**(3): p. 493-5.
181. Lee JO, Kim JY, Rhee DK, Pyo S. *Streptococcus pneumoniae ClpP protease induces apoptosis via caspase-independent pathway in human neuroblastoma cells: cytoplasmic relocalization of p53*. Toxicon, 2013. **70**: p. 142-52.
182. Kwon HY, Ogunniyi AD, Choi MH, Pyo SN, Rhee DK, Paton JC. *The ClpP protease of Streptococcus pneumoniae modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5646-53.
183. Ji W, Chen X, Ma Y, Hu D, Lu R, Zhou X, Wei L. *Effect of Kruppel like factor 4 gene silencing on apoptosis and phagocytosis of murine RAW264.7 macrophages*. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013. **29**(4): p. 341-4.
184. Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. *Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(6): p. 873-91.
185. Marriott HM, Ali F, Read RC, Mitchell TJ, Whyte MK, Dockrell DH. *Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection*. FASEB J, 2004. **18**(10): p. 1126-8.
186. Liu Y, Zheng B, Zhang XH, Nie CJ, Li YH, Wen JK. *Localization and function of KLF4 in cytoplasm of vascular smooth muscle cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(2): p. 162-8.
187. Torraca V, Masud S, Spaink HP, Meijer AH. *Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model*. Dis Model Mech, 2014. **7**(7): p. 785-97.
188. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. *Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 51-67.
189. Ohta K, Kawano R, Ito N. *Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51866.
190. Zahlten J, Herta T, Kabus C, Steinfeldt M, Kershaw O, García P, Hocke AC, Gruber AD, Hübner RH, Steinicke R, Doehn JM, Suttorp N, Hippenstiel S. *Role of Pneumococcal Autolysin for KLF4 Expression and Chemokine Secretion in Lung Epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **53**(4): p. 544-54.
191. Doss M, White MR, Tecele T, Hartshorn KL. *Human defensins and LL-37 in mucosal immunity*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 79-92.

192. Sandgren S, Wittrup A, Cheng F, Jönsson M, Eklund E, Busch S, Belting M. *The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17951-6.
193. Akahori Y, Miyasaka T, Toyama M, Matsumoto I, Miyahara A, Zong T, Ishii K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K. *Dectin-2-dependent host defense in mice infected with serotype 3 Streptococcus pneumoniae.* BMC Immunol, 2016. **17**(1): p. 1.
194. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. *Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1813-22.
195. Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C, Sethi T. *Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function.* Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 395-405.
196. McDaniel LS, Yother J, Vijayakumar M, McGarry L, Guild WR, Briles DE. *Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA).* J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 381-94.
197. Swiatlo E, Champlin FR, Holman SC, Wilson WW, Watt JM. *Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of Streptococcus pneumoniae.* Infect Immun, 2002. **70**(1): p. 412-5.
198. Yoshida T, Kaestner KH, Owens GK. *Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury.* Circ Res, 2008. **102**(12): p. 1548-57.
199. Strober W. *Trypan blue exclusion test of cell viability.* Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
200. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.

8. Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Toni Herta, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Krüppel-like Faktor 4 als Regulator der Inflammation in der Pneumokokkenpneumonie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort und Datum

Unterschrift

8.2 Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Publikation:

Toni Herta, Aritra Bhattacharyya, Christian Bollendorf, Christin Kabus, Pedro García, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel and Janine Zahlten. *DNA-release by Streptococcus pneumoniae autolysin LytA induced Krueppel-like factor 4 expression in macrophages*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5723.

Beitrag im Einzelnen:

- Ungeteilte Erstautorenschaft
- Erstellung des Manuskriptes gemeinsam mit Dr. Janine Zahlten und Professor Dr. Stefan Hippenstiel sowie Mitarbeit an der Revision und Umsetzung der Reviewer-Kommentare
- Hauptanteil an der Durchführung der Experimente zur Entschlüsselung des Induktionsmechanismus von KLF4 durch Pneumokokken in Makrophagen (jeweiliger Eigenanteil: Abbildung 1: 66%, Abbildung 2: 75%, Abbildung 3: 100%, Abbildung 4: 100%, Abbildung 5: 60%, Abbildung 6: 100%, Abbildung 7: 0%, Abbildung 8: 100%)
- Wesentlicher Anteil an der Aufarbeitung und Auswertung der erhobenen Daten
- Wesentlicher Beitrag zur kritischen Würdigung der Resultate mit Identifikation der relevanten Aussagen der Studie einschließlich ihrer Limitationen
- Selbstständige Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen

Datum und Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.4 Publikationsliste

Herta T, Petroff D, Engelmann C, Herber A, Aehling N, Scheuermann U, Bartels M, Seehofer D, Berg T, Wiegand J. *Hepatitis B vaccination in patients with liver cirrhosis evaluated for liver transplantation – a simple intervention ensures high adherence*. Ann Transplant, 2019. **24**(1): p. 527-31.

Herta T, Beuers U. *Autoimmunassoziierte Gallenwegserkrankungen: Diagnostische und therapeutische Herausforderungen*. Radiologe, 2019. **59**(4): p. 348-56.

Herta T, Verheij J, Beuers U. *IgG4-assoziierte Cholangitis – klinische Präsentation eines lange übersehenen Krankheitsbildes*. Internist (Berl.), 2018. **59**(6): p. 560-6.

Herta T, Bhattacharyya A, Bollensdorf C, Kabus C, García P, Suttorp N, Hippenstiel S, Zahlten J. *DNA-release by Streptococcus pneumoniae autolysin LytA induced Krueppel-like factor 4 expression in macrophages*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5723.

Blank V, Schierle K, Hacker U, Herta T, Vucinic V, Hoffmeister A, Mössner J, Jansen-Winkeln B, Keim V, Karlas T. *An unusual hypoechoic solid mass in the pancreatic head*. Z Gastroenterol, 2017. **55**(4): p. 375-8.

Herta T, Fischer J, Berg T. *Genetik metabolischer und viraler Lebererkrankungen*. Gastroenterologie, 2017. **12**(1): p. 16-31.

Engelmann C, Becker C, Boldt A, Herta T, Boehlig A, Splith K, Schmelzle M, Mueller N, Krohn S, Tautenhahn HM, Bartels M, Sack U, Berg T. *Ascites' neutrophil function is significantly impaired in patients with decompensated cirrhosis but can be restored by autologous plasma incubation*. Sci Rep, 2016. **6**(1): p. 37926.

Herta T, Hecker M, van Boemmel F, Hoffmeister A, Karlas T. *Sonographic diagnosis of transhepatic placement of a percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) tube*. Endoscopy, 2015. **47**(Suppl 1): p. 453-4.

Zahlten J, Herta T, Kabus C, Steinfeldt M, Kershaw O, García P, Hocke AC, Gruber AD, Hübner RH, Steinicke R, Doehn JM, Suttorp N, Hippenstiel S. *Role of Pneumococcal Autolysin for KLF4 Expression and Chemokine Secretion in Lung Epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **53**(4): p. 544-54.

8.5 Danksagung

Zuerst möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Professor Dr. med. Stefan Hippenstiel aussprechen. Er ermöglichte es mir, als Mitglied seiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden Thema zu arbeiten und stand mir jederzeit als Doktorvater und Mentor mit Ideen und Ratschlägen konstruktiv zur Seite. Durch das Stellen der entscheidenden Fragen half er mir, mich auf das Wesentliche zu fokussieren und weckte meine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten. Hervorragend unterstützt und angeleitet wurde ich zudem von Frau Dr. med. vet. Janine Zahlten. Frau Zahlten hat nicht nur inhaltlich sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, sondern mich auch persönlich sehr beeindruckt.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. med. Norbert Suttorp dafür, dass ich diese Arbeit an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie durchführen durfte.

Der technischen Assistentin Janis Hantke danke ich sehr herzlich für die unermüdliche und geduldige Unterstützung. Besonderer Dank gilt weiterhin meinen Laborkollegen Jan Naujoks, Phillip Brenya Sasu und Wilhelm Bertrams, sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hippenstiel für das tolle Miteinander und die phantastische Stimmung im Labor.

Nicht zuletzt danke ich der Jürgen Manchot Stiftung für die großzügige Finanzierung, ohne die eine Durchführung der vorliegenden Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich danke ich meiner Familie für die stets bedingungslose, fortwährende Unterstützung während meiner wissenschaftlichen Arbeit und des gesamten Medizinstudiums.

Dankeschön!

